BAND 40, HEFT 2 DEZEMBER 1960

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras / Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich

M. Klinkowski Aschersleben

H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 23 Abbildungen

1960

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 40 **Heft 2** *S. 109—220 Berlin 1960*

Postverlagsort Berlin

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE 6 JAN 1961

INHALT

Abhandlungen

BHARGAVA, K. S., and R. D. JOSHI, A distinctive strain of cabbage black ringspot virus from some ornamental plants. With 8 figures 109

NIELSEN, J., Weitere Untersuchungen zur pathologischen Physiologie von *Peronospora parasitica* auf *Brassica oleracea* 117

RIMPAU, R. H., *Entomosporium maculatum* Lév. als Erreger einer Fruchtfleckenkrankheit von *Cydonia oblonga* Mill. Mit 2 Abb. 143

SCHADE, CHR., Zur Löslichkeit des Kohlrübenmosaikvirus bei verschiedener H-Ionenkonzentration 147

DERMELJ, V., Untersuchungen über *Sphaceloma methae* Jenkins, den Erreger der Pfefferminzanthraknose. Mit 11 Abb. 151

RIGGENBACH, A., On *Fomes lignosus* (Klotzsch) Bres. the causative agent of the White Root disease of the Para rubber tree, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. With one figure 187

Kurze Mitteilungen

SUNDSTRÖM, K. R., Physiological and morphological studies of some species belonging to the genus *Exobasidium* 213

YOUSSEF, Y. A., Antagonistic action of *Penicillium chrysogenum* in the control of tomato *Fusarium* wilt. With one figure 218

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photokopiergebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/M., Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jedes Heft enthält etwa 7 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,75 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 28,— DM **Einzelpreis 30,80 DM**

From the Department of Botany, University of Gorakhpur, U. P. India

A distinctive strain of cabbage black ringspot virus from some ornamental plants

by

K. S. Bhargava and R. D. Joshi

With 8 figures

Three most common ornamental plants grown in private and public gardens include candytuft (*Iberis umbellata* L.), stock (*Matthiola incana* R. Br.) and sweet rocket (*Hesperis matronalis* L.). During 1958 to 1959 some of these plants showing unusual symptoms were noticed in Nainital. Transmission experiments showed that a virus was present and this appears to be the first record of a virus disease of these plants found naturally infected in this country. Preliminary experiments proved that one virus was involved in all the three plants and it was confirmed by subsequent experiments.

The present paper deals with the host range, transmission, properties, and identity of the causal virus.

Materials and Methods

Test plants were raised and kept in an insect proof glasshouse where usual precautions were taken to keep them free from bacterial or fungal infections. The temperature of the glasshouse was maintained between 15.5 to 28 °C. In winter and cloudy weather supplementary light was provided by fluorescent tube lamps giving 150 foot candles at pot level.

Mechanical inoculations were made by gently rubbing the leaves of healthy plants with the forefinger dipped in expressed infective sap from diseased leaves. *Raphanus sativus* L. which was found to be susceptible and which yielded a good quantity of sap was used as a source of inoculum in host range and other experiments. 400 mesh carborundum powder was used as an abrasive by lightly dusting it over the leaves before they were rubbed.

The conditions of insectary and the methods of culturing and handling the insects were the same as those described by Watson (1936, 1938).

Cultures of *Aphis gossypii* Glov. were maintained on *Cucurbita pepo* L., and of *Myzus persicae* Sulz. and *Brevicoryne brassicae* L. on cabbage.

As the virus produces countable local lesions on *Nicotiana tabacum* L., var. White Burley, quantitative infectivity tests were made by the local lesion method. Since only a few lesions were produced without an abrasive, carborundum was used, care being taken that an equal amount was dusted over all the leaves.

Symptoms on naturally infected hosts

1. *Iberis umbellata* (Candytuft). Infected plants showed no reduction in vigour but the leaves were faintly mottled. The flowers were "broken"; white streaks appearing on violet background (Fig. 1). No such symptoms appeared in white coloured variety.

2. *Matthiola incana.* (Stock). Infected plants were slightly stunted and reduced in vigour. The leaves were smaller in size and slightly crinckled. They showed inconspicuous mosaic mottling which was more prominent in summer when the temperature was high. In advanced stages of infection slightly raised dark coloured patches were also noticed. In severely affected plants margins of leaves tend to roll upwards. Older leaves were chlorotic and petals showed colour "break" in the form of white streaks (Fig. 2).

3. *Hesperis matronalis.* (Sweet Rocket). Infected plants were slightly stunted as in *Matthiola.* Young leaves showed dark green patches on the surface, while the older leaves were chlorotic and crinckled. Edges of leaves were twisted and distorted (Fig. 3). Flowers showed colour "break" similar to *Matthiola.*

Host-range and symptomatology

Young vigorously growing plants given below were mechanically inoculated with infected sap. Back inoculations were made to *Nicotiana tabacum,* var. White Burley, from inoculated and uninoculated leaves of the test plants; this detected symptomless carriers and also differentiated local from systemic infection.

Brassica campestris L. var. *Sarson* Prain. (Yellow sarson). Systemic vein-clearing of the leaves after 9 to 10 days followed by mosaic mottling. Similar symptoms appear in Indian rape (*Brassica campestris* var. *toria*). Duthie and Fuller. Indian mustard (*Brassica juncea* Czern. & Coss.), *Brassica juncea,* var.*rugosa* Roxb., and Chinese cabbage (*Brassica chinensis* L.).

Brassica napus L. Systemic vein-clearing after about ten days followed by mosaic mottling and distortion of the leaves. Plants stunted.

Brassica nigra Koch. (Black mustard) and *Brassica juncea* var. *ramosa* "Lahi". Systemic vein-clearing and mottling after 9 to 10 days (Fig. 4). Leaves distorted, plants stunted and pods reduced in size.

Brassica oleracea var. *capitata* L. (Cabbage). Small black necrotic spots after 8 to 10 days. No systemic infection (Fig. 5). Similar symptoms appear

Fig. 1. Infected flowers of candytuft showing colour "break" in petals

Fig. 2. Infected twig of stock showing colour "break" in flowers

Fig. 3. Diseased leaf of sweet rocket showing distorted margin

Fig. 4. Healthy (left) and diseased (right) leaves of *Brassica juncea* var. *ramosa*. Diseased leaf shows mottling und distortion

Fig. 5. Local lesions on inoculated leaf of cabbage

Fig. 6. Infected leaf of radish showing bright mosaic mottling

Fig. 7. Local lesions on diseased leaf of tobacco

Fig. 8. Diseased leaf of *Chenopodium album* showing local lesions

in *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. (Cauliflower) and *Brassica oleracea* var. *gemmifera* Zenker. (Brussels sprout).

Brassica rapa L. (Turnip). Systemic vein-clearing followed by mosaic mottling with dark bands along the veins.

Lepidium sativum L. (Garden cress). Systemic vein-clearing followed by mosaic mottling together with slight distortion of leaves.

Nasturtium officinale R. Br. (Water-cress). Faint vein-clearing after about ten days along with chlorotic spots followed by mottling. Leaves slightly distorted.

Raphanus sativus L. (Radish). Systemic vein-clearing in about 12 to 15 days followed by vein-banding and brilliant mottling (Fig. 6).

Nicotiana tabacum, var. White Burley (Tobacco). Numerous necrotic local lesions after 5 to 7 days. Lesions necrotic brown at outer edges with a lighter centre, tending to enlarge with age. No systemic spread (Fig. 7).

Nicotiana glutinosa L. Symptomless local infection. Not recoverable from uninoculated leaves. Similar symptoms in *N. rustica* L.

Petunia hybrida Vilm. (Common garden petunia). Symptomless systemic carrier.

Zinnia elegans Jacq. Faint chlorotic spots on the younger leaves followed by mosaic mottling. Petals show colour "break".

Chenopodium album L. (Goosefoot). Necrotic local lesions after about one week. No systemic infection (Fig. 8).

Stellaria media Vill. Faint chlorotic spots on younger leaves after 10 to 12 days, replaced by mosaic mottling.

All attempts to infect the following plants were unsuccessful: *Cucumis sativus* L. (Cucumber), *Cucurbita pepo* L. (Vegetable marrow), *Phaseolus vulgaris* L. (Dwarf bean), *Vigna sinensis* Endl. (Cow pea), *Solanum nigrum* L. (Black nightshade), *Capsicum annuum* L. (Chilli), *Datura stramonium* L. (Thorn apple), *Mirabilis jalapa* L., *Tropaeolum majus* L. (Garden nasturtium) and *Zea mays* L.

Physical properties

Dilution end point. Infective sap was diluted with sterilised distilled water to obtain different dilutions. *Nicotiana tabacum* var. White Burley, which produces countable local lesions was used as test plant. The results are summarized in table 1.

The above results show that the virus was infective at a dilution of 1 : 10 000.

Thermal inactivation point: 2 ml. of infective sap was put in thin walled glass tubes in a water bath. After heating at different temperatures for ten minutes the tubes were readily cooled and the sap rubbed on half leaves of tobacco plants. The results are given in table 2.

The above results indicate that the thermal inactivation point for this virus lies between 55 to 60 °C.

Longevity "in vitro": 4 ml. of infective sap in different tubes were kept at 20 to 22 °C in an incubator for various periods. Inoculations were made after every 24 hours. The results are shown in table 3.

Table 1

Average number of local lesions on tobacco produced on half leaf by various dilutions

Dilution	Average local lesions per half leaf
undiluted	125.0
1 : 10	120.0
1 : 100	20.0
1 : 1000	4.0
1 : 10 000	0.2
1 : 100 000	0.0

Table 2

Average number of local lesions on opposite half leaf of tobacco with sap heated at different temperatures

Temperature °C	Average local lesions per half leaf
unheated	85.0
45	50.0
48	41.0
50	9.5
53	5.9
55	4.0
60	0.0

Table 3

Average number of local lesions on tobacco leaf produced after every 24 hours

Storage time in days	Average local lesions per leaf
0	136.0
1	94.0
2	82.0
3	60.0
4	50.0
5	40 0
6	9.0
7	4.2
8	2.0
9	0.4
10	0.2
11	0.0

These results indicate that the virus can remain infective in crude sap for 10 days at 20 to 22 °C.

Insect transmission

The virus is easily transmitted by *Aphis gossypii* Glover., *Myzus persicae* Sulz. and *Brevicoryne brassicae* L., and is of non-persistent type.

Seed transmission

500 seeds from five diseased plants of candytuft were sown and kept under observation for one and a half month. All seedlings from these seeds were healthy showing thereby that the virus was not carried in the seeds of diseased plants.

Discussion

Smith (1957) in his recent book has recognised only eight viruses affecting *Cruciferae*. Out of these Radish mosaic virus and Arabis mosaic virus are not transmitted by aphids. Turnip crinckle virus and Turnip yellow mosaic virus are transmitted only by beetles. Out of the rest which are transmitted by aphids, Cabbage ring necrosis virus is probably related to

Cabbage black ringspot virus and Stock mosaic virus is different because it is not transmitted to cabbage, cauliflower and *Nicotiana*. Of the remaining two viruses Cauliflower mosaic virus is characterised by its thermal inactivation temperature being slightly above 70 °C, its dilution end point about 1 : 2000, its host-range limited to *Cruciferae* and its more severe symptoms at temperature below 20 °C. Cabbage black ringspot virus has a thermal inactivation point near 60 °C, its dilution end point is about 1 : 10 000, its host-range is not limited to *Cruciferae* and its symptoms are more severe at temperatures above 24 °C. BROADBENT (1957) has also recently reviewed viruses affecting *Brassica* crops in Great Britain.

Earlier WALKER, LEBEAU and POUND (1945) concluded that the aphid transmitted viruses of crucifers fell into two groups, viz., "Cauliflower virus I" and "Turnip virus I". SYLVESTER (1953) agreed with this classification of aphid borne crucifer viruses of WALKER et al. (1945), but proposed an intermediate group which he called "Radish virus I" group, because of differences in resistance to heat.

Several *Brassicae* are grown in India for different reasons but mostly for the oil they yield. Very little work has been done on the virus diseases of these crops in this country. A mosaic of radish was recorded from Bombay as early as 1923 by MCRAE and from Poona by KULKARNI (1924). Later on RAYCHAUDHURI and PATHANIAN (1955) described a mosaic disease of radish from Delhi. This virus has a host-range limited to *Cruciferae* and is considered distinct from radish mosaic virus described by previous workers. Recently a mosaic of Chinese Sarson has been reported by AZAD and SEHGAL (1959) from Simla. The virus, according to them, belongs to "Turnip virus I" group. It does not produce any infection in cabbage, cauliflower, Brussels sprout, radish, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana rustica* and *Petunia hybrida*.

The virus in the present study falls into "Turnip virus I" group and broadly resembles Cabbage black ringspot virus of Smith in having thermal inactivation point between 55 to 60 °C, dilution end point 1 : 10 000, its host-range not limited to *Cruciferae* and in producing more severe symptoms at higher temperatures. However, it differs from the type virus in its storage time, in its reaction with some host plants as it produces only local lesions on cabbage, cauliflower and Brussels sprout; symptomless local infection in *Nicotiana glutinosa* and *Nicotiana rustica;* and symptomless systemic infection in *Petunia hybrida*. SMITH (1957) has already mentioned two strains of cabbage black ringspot virus, viz., Watercress mosaic virus and *Tropaeolum* mosaic virus which differ from the type virus in their behaviour towards certain hosts. The virus under study appears to be a distinct strain of Cabbage black ringspot virus.

Summary

A mosaic disease of ornamental plants belonging to *Cruciferae*, viz., *Iberis umbellata*, *Matthiola incana* and *Hesperis matronalis* was noticed

during 1958 to 1959 in Nainital. The virus in all the three plants is identical. It is sap transmissible and is also carried by *Aphis gossypii, Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae*. It is of non-persistent type and is not transmitted through seed.

The virus falls into "Turnip virus I" group and broadly resembles cabbage black ringspot virus in its physical properties and host-range, but is distinct in producing only local lesions on cabbage, cauliflower, Brussels sprout; symptomless local infection in *Nicotiana glutinosa* and *Nicotiana rustica*; and symptomless systemic infection in *Petunia hybrida*. It is, therefore, regarded as a distinct strain of Cabbage black ringspot virus.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Scientific Research Committee, Uttar Pradesh, for financial assistance during the course of investigations. They are also indebted to Dr. S. C. Gupta for taking the photographs, and to Mr. S. Kanakaraj David, Assistant Entomologist, Agriculture College and Research Institute, Coimbatore for kindly identifying the aphids.

Zusammenfassung

In Nainital (Nordindien) wurde in den Jahren 1958 und 1959 an verschiedenen Cruciferen, so an *Iberis umbellata, Mattiola incana* und *Hesperis matronalis* eine Viruskrankheit beobachtet. Das mosaikauslösende Virus ist bei den drei Wirtspflanzen identisch. Es kann durch Preßsaft oder auch durch *Aphis gossypii, Myzus persicae* oder *Brevicoryne brassicae* übertragen werden. Das Virus ist in den Insekten nicht persistent; es kann durch Samen nicht übertragen werden.

Das Virus gehört zur „Turnip virus I"-Gruppe und hat sehr ähnliche physikalische Eigenschaften und einen ähnlichen Wirtspflanzenkreis wie das Virus der Schwarzringfleckigkeit des Kohles, doch löst es an Kohl, Blumenkohl und Rosenkohl nur lokale Läsionen aus. An *Nicotiana glutinosa* und *Nicotiana rustica* sind die lokalen Infektionen symptomfrei, und an *Petunia hybrida* sind auch systemische Infektionen symptomfrei. Das neu gefundene Virus wird als ein besonderer Stamm des Virus der Schwarzringfleckigkeit des Kohls betrachtet.

References

Azad, R. N., and O. P. Sehgal, 1959: A mosaic disease of Chinese sarson (*Brassica juncea* [Linnaeus] Coss. var. *Rugosa* Roxb.). Indian Phytopath. **12**, 45—62.

Broadbent, L., 1957: Investigation of Virus Diseases of *Brassica* Crops. Agric. Res. Counc. Rep. Ser. No. 14, Cambridge Univ. Press.

Kulkarni, G. S., 1924: Mosaic and other related diseases of crops in Bombay Presidency. Poona Agric. Coll. Mag. **16**, 6—12. Rev. Appl. Mycol. **4**, 110—111.

McRae, W., 1924: Economic Botany, Part III. Mycology. Ann. Rept. Board Scientific Advice, India, **1922—23**, 31—35.

Raychaudhuri, S. P., and P. S. Pathenian, 1955: A mosaic disease of radish (*Raphanus sativus* L.). Indian Phytopath. **8**, 99—104.

Smith, K. M., 1957: A Text-Book of Plant Virus Diseases. Second Edition. J. and A. Churchill Ltd., London.

Sylvester, E. S., 1953: Host range and properties of *Brassica nigra* virus. Phytopathology **43**, 541—546.

Walker, J. C., F. J. LeBeau and G. S. Pound, 1945: Viruses associated with cabbage mosaic. J. Agr. Res. (U. S.) **70**, 379—404.

Watson, M. A., 1936: Factors affecting the amount of infection obtained by aphis transmission of the virus Hy. III. Phil. Trans. Roy. Soc. B., **226**, 457—489.

— —, 1938: Further studies on the relationship between *Hyoscyamus* Virus 3 and the aphid *Myzus persicae* (Sulz.) with special reference to the effects of fasting. Proc. Roy. Soc. B., **125**, 144—170.

Aus dem Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz
der Georg-August-Universität zu Göttingen
Direktor: Prof. Dr. W. H. Fuchs

Weitere Untersuchungen zur pathologischen Physiologie von *Peronospora parasitica* auf *Brassica oleracea*[1])

Von

J. Nielsen[2])

In neuerer Zeit gewinnen eingehende Untersuchungen über das Verhältnis von Wirt und Parasit immer größeren Raum und verändern und vertiefen das Verständnis für das vielfältige Wechselspiel zwischen den Partnern einer parasitären Symbiose (vgl. Allen 1959 a, 1959 b, Rohringer 1959, Uritani und Akazawa 1959). Der Fortschritt auf diesem Arbeitsgebiet wurde in erster Linie durch intensive Bearbeitung einzelner, für die Behandlung bestimmter Teilfragen jeweils besonders geeigneter, Modellfälle erzielt. In diesem allgemeinen Rahmen (Fuchs 1956) sollen die Studien von Heitefuss (1957) über *Peronospora parasitica* an *Brassica oleracea* unter besonderer Berücksichtigung des Ketosäurestoffwechsels in zwei Richtungen ergänzt werden:

1. Das Bild der biochemisch faßbaren infektogenen Veränderungen ist abzurunden.
2. Die Kenntnisse über den Eingriff bestimmter infekthemmender Stoffe sind zu vertiefen.

A. METHODIK

I. Anzucht der Pflanzen, allgemeine Methodik

Alle Versuche wurden mit Weißkohl, Sorte „Ruhm von Enkhuizen", durchgeführt, die gegenüber der von Heitefuss verwandten „Braunschweiger" den Vorzug hat, bei ungünstigen Lichtbedingungen nicht so leicht zu etiolieren. Vorversuche hatten gezeigt, daß beide Sorten auf Infektion und Hemmstoffe gleich reagieren.

Die Pflanzen wurden in Töpfen mit gedämpfter Erde im Gewächshaus angezogen und in den Monaten Oktober bis März in der Zeit von 5 bis 22 Uhr mit Radium-Hg-Dampf-Hochdrucklampen HRL 250 mit Radalreflektoren mit einer Lichtstärke von 2000 bis 2500 Lux in Pflanzenhöhe beleuchtet.

[1]) D 7 Auszug aus gleichnamiger Dissertation.

[2]) Anschrift: Canad. Dept. Agric. Res. Sta. Box 6200, Winnepeg 1 (Manitoba), Canada.

Für Versuche unter definierten Lichtbedingungen wurden die Pflanzen nach 10 Tagen aus dem Gewächshaus in eine ausschließlich künstlich beleuchtete Kammer (Lichtquelle Radium-Hg-Dampf-Hochdrucklampe HRL 400 mit Radalreflektoren über einer zur Abschirmung der Wärmestrahlen eingerichteten Glaswanne mit 1 bis 1,5 cm Wasserschicht) bei 55 bis 60 % Luftfeuchtigkeit und 22 bis 24 °C bei einer Lichtmenge in Pflanzenhöhe von 6000 bis 6500 Lux während 16 Stunden übertragen. Für die Durchführung der Versuche wurde die Luftfeuchtigkeit auf 95 bis 98 % bei gleicher Beleuchtungsstärke erhöht.

Zu den Versuchen fanden im allgemeinen 14 bis 18 Tage alte Pflanzen Verwendung. Die Infektion mit *Peronospora parasitica* erfolgte nach der von HEITEFUSS (1957) geübten Technik. Am vierten Tage nach der Infektion waren die Blätter etwas aufgehellt, zeigten vereinzelt bereits winzige Nekrosen und reichliche Fruktifikation des Pilzes. In diesem Zeitpunkt wurden die Keimblätter zu Analysen aufgearbeitet.

Als Hemmstoffe wurden Äthylurethan, Fluoressigsäure, Semicarbazid (SC) und Thiosemicarbazid (TSC) in den gleichen Konzentrationen wie von HEITEFUSS, in einzelnen Versuchen auch Harnstoff und Thioharnstoff, angewendet.

Zur Applikation der wäßrigen Lösungen wurden die gegebenenfalls mit 1 n NaOH auf pH 4,5 eingestellten Lösungen in 6 ml fassende Präparatengläser gefüllt, in welche die abgeschnittenen Keimpflanzen eingestellt wurden. In gleicher Weise ließen wir in anderen Versuchsreihen organische Säuren und Zucker von den Pflanzen aufsaugen. Die Vergleichspflanzen wurden in Leitungswasser gehalten. Da einige der verwendeten Hemmstoffe bei längerer Einwirkungszeit als 48 Stunden unter unseren Bedingungen die Pflanzen schädigten, begnügten wir uns mit zweitägiger Einwirkung. HEITEFUSS konnte bei etwas anderen Außenbedingungen mit vier- bis fünftägiger Einwirkungszeit arbeiten. Stichproben zeigten, daß hier in wesentlichen Ergebnissen keine durch diesen Unterschied bedingte Verschiedenheiten auftraten.

Zur Analyse wurden die Pflanzen nach 48 Stunden den Gläschen entnommen, die benetzten Stengelteile entfernt und die Blätter aufgearbeitet.

II. Analytische Methoden

a) Bestimmung der Ketosäuren als 2,4-Dinitrophenylhydrazone

Zur Extraktion des Pflanzenmaterials wurde die Methode von ALFTHAN und VIRTANEN (1955) etwas abgewandelt:

5 g frische Blätter wurden in einer vorgekühlten Lösung, bestehend aus 12 ml Wasser, 7,5 ml H_2SO_4 (0,75 n) und 7,5 ml Na_2WO_4 (10 %ig), unter Kühlung im Bühler-Homogenisator zerkleinert. Das Homogenat wurde 15 Minuten bei 2 bis 4 °C und 20 000 g zentrifugiert, der Überstand mit 7,5 ml 1 % Dinitrophenylhydrazin in 5 n H_2SO_4 versetzt und 45 Minuten im Wasserbad bei 25 °C gehalten. Der Niederschlag, welcher u. a. einen Teil der nichtsauren Hydrazone enthält, wurde bei Zimmertemperatur abzentrifugiert.

Der Überstand wird zweimal mit je 20 ml und dreimal mit je 10 ml Äthylazetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Äthylazetatauszüge werden viermal mit je 10 ml 10 % Na_2CO_3 ausgeschüttelt. Die Na_2CO_3-Fraktion wird mit vorgekühlter 5 n H_2SO_4 auf etwa pH 1 gebracht und anschließend mit viermal je 10 ml Äthylazetat ausgeschüttelt.

Die vereinigten Äthylazetatfraktionen werden über geglühtem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuumtrockner eingeengt. Der Rückstand wird mit insgesamt 7,5 ml Äthylazetat quantitativ in ein 10-ml-Präparatenglas übergeführt, mit warmem Luftstrom eingetrocknet und schließlich in 1 ml Äthylazetat gelöst. 0,2 ml entsprechen 1 g frischer Ausgangssubstanz.

Zur Trennung der Ketosäure DNPH wurden Ringchromatogramme auf S. & S.-Papier 2045 bGl in verschiedenen Fließmitteln (siehe unten) verwendet. Zur Trennung größerer Substanzmengen dienten absteigende Chromatogramme auf S. & S.-Papier 2071. Im Boden des Chromatographiegefäßes wurden dem jeweiligen Fließmittel entsprechende Gemische ver-

wendet, in denen das Wasser durch 3%ige NH_3-Lösung ersetzt war, um die Atmosphäre schneller zu sättigen und alkalisch zu halten. Auf Äquilibrierung wurde verzichtet.

Zahlreiche von anderer Seite beschriebene (Paech-Tracey 1956) Fließmittel (FM) gaben keine befriedigende Trennung. Eigene Versuche führten zu folgenden Gemischen:

FM 1, zur Trennung aller Ketosäure-DNPH:

s-Butanol-H_2O, 8 : 2, Laufzeit im Ringchromatogramm über Docht auf 20 bis 22 Stunden eingestellt;

FM 2, zur Trennung der in FM 1 langsam laufenden Ketodicarbonsäuren:
Methyläthylketon-s-Butanol-H_2O, 10 : 3 : 2, Laufzeit 10 bis 12 Stunden.

Die genannten Fließmittel ergaben in allen Versuchen scharfe Trennungen mit den in Tabelle 1 (vgl. Seite 121) zusammengestellten Rf-Werten. Da im FM 2 die Ketomonocarbonsäuren mit hohem Rf-Wert zusammengedrängt liegen, empfiehlt es sich, die langsamer laufenden Verbindungen, vor allem die Ketodicarbonsäure-DNPH, durch den relativen Rf-Wert zur Glyoxylsäure (Rf_G-Werte) zu charakterisieren.

Die Identifizierung der Ketosäure-DNPH erfolgte

1. durch Vergleich der Rf-Werte und Cochromatographie mit reinen Vergleichssubstanzen in allen Fließmitteln unter Beurteilung der nach Besprühen des trockenen Chromatogramms mit 5 % KOH in 75%igem Methanol auftretenden charakteristischen Färbung (vgl. Tab. 1, Seite 121).
2. durch Elution der Fläche aus dem Chromatogramm und katalytische Hydrierung der DNPH nach folgendem Verfahren:

In die von Cheronis (1957) beschriebene Apparatur wurde in Anbetracht der geringen Substanzmengen zur Einleitung des Wasserstoffs statt eines Mikrodispersers eine Kapillare eingesetzt, die in den tiefsten Punkt des konischen Hydriergefäßes hinabreichte.

3 mg Platinoxydkatalysator wurden in 250 μl Eisessig oder 85%igem Isopropanol 3 Minuten lang vorhydriert. Das DNPH wird in 250 μl des gleichen Lösungsmittels zugegeben. Hydriert wurde etwa 10 Minuten über Entfärbung hinaus bei Zimmertemperatur und gewöhnlichem Druck. Die nach Beendigung der Reaktion entstehenden lebhaft gefärbten Oxydationsprodukte des Hydrazinrestes stören bei der anschließenden zweidimensionalen Chromatographie der Aminosäuren nicht, da sie in Phenol mit der Front wandern. Daher kann die hydrierte Lösung nach Abfiltrieren des Katalysators sofort auf das Chromatogramm gebracht und in Anlehnung an das von Rohringer (1957) geübte Verfahren zur Trennung der entstandenen Aminosäuren zweidimensional chromatographiert werden.

Die mit Ninhydrin sichtbar gemachten Aminosäuren wurden durch Cochromatographie identifiziert.

Die untere Nachweisgrenze liegt für die DNPH von Ketoglutarsäure, Oxalessigsäure, Glyoxylsäure und Brenztraubensäure bei etwa 50 μg. Die Hydrierung von Hydroxybrenztraubensäure führte zu Serin, Alanin, Glycin (siehe auch Meister und Abendschein 1956).

Die Mengen der Ketosäure-DNPH wurden nicht quantitativ bestimmt, da vorerst in erster Linie relative Konzentrationsverschiebungen durch die Versuchsbehandlung interessieren, letztere wurden nach folgendem Verfahren abgeschätzt:

Auf einem Ringchromatogramm wurden 50 μl des Extraktes unbehandelter Vergleichspflanzen auf einem Sektor aufgetragen, auf den Nachbarsektoren in ganzzahligen Verhältnissen verdünnte Lösungen der zu prüfenden Extrakte. Die Verdünnung wurde so lange fortgesetzt, bis die Breite der Zone, Farbintensität bei Tageslicht, im UV und nach Besprühen mit KOH mit der Kontrolle übereinstimmten.

Wenn also z. B. bei einer Auftragsmenge von 25 μl des Extraktes nach Fluoressigsäurebehandlung die Glyoxylsäurezonen sich glichen, wurde angenommen, daß die Glyoxylsäure sich nach dieser Behandlung verdoppelte.

Wenn die Behandlung die Ketosäure-DNPH-Konzentration verminderte, wurde ein Vielfaches von 50 μl aufgetragen. Nach unseren Erfahrungen läßt sich auf diesem Wege maximal eine Differenz von 20 % mit einiger Sicherheit erfassen.

b) Messung von Enzymaktivitäten

Zur Herstellung der in unseren Versuchen verwendeten Enzymrohlösung wurden 6 bis 8 g frisches Pflanzenmaterial in einem vorgekühlten Mörser mit Quarzsand verrieben und bei 2 bis 4 °C und 25 000 g 15 Minuten lang zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde bis zum Gebrauch in Eiswasser gekühlt.

Als Bezugsgröße für die Aktivitätsbestimmung wurde in den Infektionsversuchen der Trockensubstanzgehalt der Rohlösung, bei den Versuchen mit Hemmstoffen das Volumen der Rohlösung verwendet. Der Trockensubstanzgehalt wurde durch vorsichtiges Eindunsten und Trocknen von zweimal 1 ml der Rohlösung bestimmt. Hierbei zeigte es sich, daß der Extrakt infizierter Blätter etwa durchschnittlich 8 % mehr Trockensubstanz enthält als der nichtinfizierter.

Die Enzymaktivität wurde bestimmt für

1. Ascorbinsäureoxydase nach DAWSON und MAGEE (1955) manometrisch,
2. Glykolsäureoxydase nach CLAGETT, TOLBERT und BURRIS (1949) manometrisch,
3. Glyoxylsäurereductase nach ZELITCH (1955), spektrophotometrisch,
4. Transaminase in Anlehnung an COHEN (1955), dessen Methode für die Verarbeitung pflanzlicher Gewebe und die vorhandenen technischen Möglichkeiten folgendermaßen modifiziert werden mußte:

In 15 ml Warburggefäßen wurden 0,05 ml Enzymrohlösung, 0,5 ml Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7,7) bzw. eine entsprechend konzentrierte Lösung von Pyridoxalphosphat in diesem Puffer und 0,5 ml Wasser bzw. Hemmstofflösung 10 Minuten bei 30 °C äquilibriert; dann wurden 1,0 ml dl-Alanin (100 μM/ml in obigem Puffer) und 0,5 ml α-Ketoglutarsäure (50 μM/ml in Puffer) zugegeben und 1 Stunde bei 30 °C geschüttelt. Dann wurde die Reaktion durch 5 Minuten Eintauchen der Gefäße in siedendes Wasser gestoppt. Nach dem Erkalten wurde der Gefäßinhalt durch Zugabe von 0,3 ml 3 M-Azetatpuffer, pH 5,0, auf dieses pH eingestellt. In den Seitenarm kam 0,5 ml einer Aufschwemmung von Glutaminsäure-Decarboxylase (Trockenpräparat aus *Clostridium welchii* 15 mg/ml) in 0,1 M-Azetatpuffer, pH 5,0. Das Enzym wurde nach 10 Minuten Äquilibrieren nach dem Schließen der Hähne zugekippt und anschließend 60 Minuten geschüttelt (Frequenz 100, Amplitude 2 cm). Die Verlängerung der Reaktionszeit gegenüber der Originalvorschrift erwies sich als nötig, da Zugabe von TSC und SC, ohne den Endwert zu beeinflussen, die Wirkung der verwendeten Glutaminsäuredecarboxylase verzögerte, während die Decarboxylierung von 5 μM Glutaminsäure ohne Zusatz von SC und TSC in rund 30 Minuten beendet war, dauerte sie unter Einwirkung dieser Hemmstoffe in einer Konzentration von $1{,}8 \times 10^{-1}$ M rund 45 Minuten. Zur Sicherheit wurde in allen Versuchen daher eine Decarboxylierungszeit von 60 Minuten eingehalten.

B. ERGEBNISSE

I. Durch die Infektion bedingte Veränderungen

An unserem Objekt hatte HEITEFUSS (1957) bei Untersuchung der Veränderungen der Amino- und organischen Säuren vor allem einen starken postinfektionellen Anstieg der Äpfelsäure nachgewiesen und damit die Frage nach der Ursache dieser Veränderung aufgeworfen. Da Äpfelsäure, abgesehen von anderen metabolischen Verknüpfungen, in direktem Zusammenhang mit

drei Ketosäuren des Tricarbonsäurestoffwechsels steht, wurde vor allem nach postinfektionellen Veränderungen im Bereich der Ketosäuren gefahndet und eine Ergänzung der Untersuchungen von Heitefuss über die Äpfelsäuredehydrogenase durch andere Enzymuntersuchungen ins Auge gefaßt.

a) Postinfektionelle Veränderungen des Ketosäurebestandes

In gesunden Keimpflanzen, wie auch stichprobenweise an älteren Blättern, wurden folgende Ketosäuren nachgewiesen:

Brenztraubensäure (BTS), Ketoglutarsäure (KGS), Oxalessigsäure (OES), Hydroxybrenztraubensäure (Hydroxy-BTS) und Glyoxylsäure (GS), neben zwei weiteren Verbindungen (C und D), deren Identifizierung bisher nicht gelang (vgl. Tab. 1).

Tabelle 1

Die in Kotyledonen von Kohl nachgewiesenen Ketosäuren

Nr.	DNPH der Ketosäuren	Färbung mit KOH	Rf- (bzw. Rf_G-) Werte	
			FM 1 Rf	FM 2 Rf_G
1	unbekannt A	karmin	7	22
2	unbekannt B	karmin	13	47
3	KGS	olivgrün	16	55
4	OES	braun	20	65
5	unbekannt C[2])	purpur	36	95
6	GS I[1])	orangerot	38	100
7	Hydroxy-BTS[2])	gelborange	45	
8	BTS I[1])	braunviolett	47	
9	GS II	rotbraun	53	
10	BTS II	braun	59	
11	unbekannt D	braun	67	

[1]) GS und BTS liefen mit je zwei Zonen infolge der Bildung isomerer DNPH (Meister und Abendschein 1956).

[2]) Die Zonen 5 bis 6 und 7 bis 8 gingen auf dem Ringchromatogramm in FM 1 ineinander über, ihre eindeutige Trennung ließ sich nur absteigend über die Länge eines ganzen Bogens erreichen.

Durch Infektion ändert sich der Gehalt an den genannten Verbindungen nicht augenscheinlich, wie übereinstimmend aus acht Versuchsreihen hervorgeht. Dies gilt unabhängig davon, daß nach den Bedingungen der Versuchsdurchführung sowohl der Ketosäurespiegel als solcher, als auch das gegenseitige Verhältnis zweier Ketosäuren je nach den Lichtbedingungen schwankte. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Krupka (1958) an Weizenkeimpflanzen überwog in unseren Versuchen bei hoher Lichtintensität KGS, bei geringer GS sowohl bei nichtinfizierten wie bei infizierten Pflanzen.

Somit erscheint keine etwa über den Carbonsäurezyklus laufende Beziehung zwischen dem Gehalt an OES, BTS und GS und der von Heitefuss beobachteten Vermehrung der Äpfelsäure zu bestehen. Jedoch traten in den

Extrakten infizierten Materials regelmäßig zwei zusätzliche Ketosäure-DNPH auf, die als A und B bezeichnet werden. Sie sind durch besonders niedrige Rf-Werte und durch mehr karminrote Färbung nach Behandlung mit KOH gekennzeichnet. Ihre Eigenschaften entsprechen keiner im Pflanzenreich bisher festgestellten Ketosäure, soweit wir bisher feststellen konnten.

Da gleiche Färbung und die ähnliche Lage der Rf-Werte einen nahen Zusammenhang der unbekannten Verbindungen nahe legten, Verbindung B aber in größerer Menge vorkam, wurde deren Isolierung und Charakterisierung versucht, über welche an anderer Stelle eingehender berichtet werden soll.

Die bisherigen Feststellungen seien jedoch stichwortartig aufgeführt:

Die Verbindung B kommt auch in mehrere Wochen und Monate alten infizierten Blättern von Weiß-, Rot-, Wirsing- und Rosenkohl vor, die Menge entspricht etwa der in jungen Blättern gefundenen. Außerdem tritt sie nach Infektion von Weißkohl mit *Erysiphe* auf, dagegen nicht nach Infektion mit *Botrytis.*

Das DNPH von Substanz B läßt sich durch das FM 2, absteigend, sauber von allen anderen DNPH abtrennen. Es besteht somit die Möglichkeit zur Gewinnung der reinen Substanz. Diese Möglichkeit nutzend, wurden folgende Eigenschaften des B-DNPH ermittelt:

1. Es ist nicht mit Oxalbernsteinsäure-DNPH, das in Reinsubstanz verglichen werden konnte, identisch;
2. es handelt sich nicht um eine phosphorylierte Verbindung, da die Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reaktion negativ ausfiel;
3. durch die Natriumschmelze nach CHERONIS wurde kein Schwefel gefunden;
4. Einwirkung von Brom in Eisessig ändert weder die Rf-Werte noch die Anfärbung mit Alkali, eine Doppelbindung ist daher unwahrscheinlich;
5. bei Hydrierung des B-DNPH nach der auf Seite 119 beschriebenen Methode konnte nach zweidimensionaler, papierchromatographischer Trennung nur eine ninhydrinpositive Substanz nachgewiesen werden. Ihre Rf-Werte waren in der ersten Dimension 45 (Fließmittel siehe ROHRINGER), in der zweiten Dimension 25. Glutaminsäure hat in diesen FM die Rf-Werte 38 bzw. 23.

Bisher reichten die Mengen zu eingehender chemischer Charakterisierung nicht aus.

Das Dinitrophenylderivat dieser unbekannten Aminosäure, dargestellt nach der Methode von KOCH und WEIDEL, hatte im FM der ersten Dimension, n-Propanol-0,5 n NH_3-Lösung, 9 : 1, den Rf-Wert 5 (Glutaminsäure ebenfalls 5), in dem der zweiten Dimension, 1,5 M Phosphatpuffer pH 6, den Rf-Wert 115 (Glutaminsäure 100).

Die freie, nicht in das DNPH überführte Ketosäure ist relativ stabil: Wird ein Gewebebrei aus infizierten Blättern 30 Minuten lang ohne Stabili-

sator oder Eiweißfällungsmittel stehen gelassen, so ist Substanz B nach Aufarbeitung nur geringfügig vermindert. Gleiches gilt für die Erhitzung eines Gewebebreies auf 80 °C für 5 Minuten.

Nach Fraktionierung eines wäßrigen Pflanzenextraktes durch Ionenaustauscher läßt sich die freie Ketosäure papierchromatographisch von den anderen untersuchten Ketosäuren trennen und spezifisch nachweisen. Über ihre Natur und Eigenschaften wird nach Abschluß laufender Arbeiten zu berichten sein.

Unabhängig von den Versuchen zur Charakterisierung der Substanz „B" wurden Untersuchungen darüber angestellt, ob ihre Bildung auf anderem Wege als durch Infektion erzwungen werden kann. Hierzu wurden in erster Linie nach der auch bei den später noch zu besprechenden Hemmstoffversuchen angewandten Technik vor allem Zucker und organische Säuren den Pflanzen zugefüttert und die Veränderungen des Ketosäuregehalts untersucht. In den meisten Versuchen trat die gesuchte Substanz „B" nicht auf. Es ergaben sich jedoch in mehrmaliger Wiederholung der Versuche übereinstimmende charakteristische Konzentrationsänderungen der bekannten Ketosäuren, welche hier kurz erörtert seien, obgleich sie keine unmittelbare Beziehung zu unserer Fragestellung haben (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2

Veränderung des Ketosäurespiegels durch Zufuhr organischer Säuren

Pflanzen 48 Stunden eingestellt in	Relative Konzentration der					
	M	KGS	OES	BTS	GS	Hydroxy-BTS
Kontrolle	—	1	1	1	1	1
Zitronensäure	4×10^{-2}	4	3	2	2	2
Bernsteinsäure	5×10^{-2}	2	3	2	1	1
Fumarsäure	2×10^{-2}	2	3	2	1	1
Äpfelsäure	5×10^{-2}	2	2	2	1	2
Malonsäure	2×10^{-2}	0,3	1	3	1	2
Maleinsäure	2×10^{-2}	2	1	1	1	1
Oxalsäure	2×10^{-2}	1	1	1	1	1
Weinsäure	5×10^{-2}	0,5	1	1	1	1
Glycolsäure	5×10^{-2}	2	2	1	1	1
Ascorbinsäure	10^{-2}	2	1	2	2	4
Allantoin	2×10^{-2}	1	1	1	4	1

Die Übereinstimmung mehrerer, unter gleichen Bedingungen jeweils in der Mitte der täglichen Assimilationsperiode durchgeführter, unabhängiger Analysen berechtigt — wenigstens in erster Annäherung — zu einigen deutenden Bemerkungen:

Abgesehen von Oxalsäure werden durch alle anderen zugefütterten Verbindungen Veränderungen bedingt. Alle Glieder des Zitronensäurezyklus erhöhen beträchtlich den KGS- und OES-Spiegel, aber auch die Menge der BTS; Zitronensäurezugabe erhöht besonders stark den Gehalt an KGS als der ihr nahestehenden Ketosäure, an unserem Objekt auch den GS-Gehalt im Gegensatz zu Beobachtungen an Weizen (KRUPKA und TOWERS 1958). Falls es sich hier nicht um umweltbedingte Unterschiede handelt, wäre die Frage erwägenswert, ob hier ein metabolischer Unterschied zwischen Weizen und Kohl besteht. Ein Zusammenhang zwischen Zitronensäure und GS wäre über den Glyoxylatzyklus denkbar, welcher vor allem in zu Fettsäureabbau befähigten Blättern höherer Pflanzen nachgewiesen wurde (KORNBERG und BEEVERS 1957).

Da Kruziferen sich in dieser Hinsicht von Weizen wohl unterscheiden, könnte die unterschiedliche GS-Anreicherung nach Zitronensäurefütterung hier eine Erklärung finden, um so mehr, als bei den beiden hier verglichenen Objekten nach Zufütterung von Glycolsäure zwar KGS und OES, aber nicht GS angehäuft wird (vgl. KRUPKA und TOWERS 1958). Falls nicht angenommen wird, daß zugeführte Glycolsäure auf einem besonderen Wege weitgehend oxydiert wird und sich grundsätzlich anders verhält als die im Stoffwechsel selbst entstehende, können die Versuchsergebnisse nur so gedeutet werden, daß nachweisbare GS kaum aus Glycolsäure entsteht. Dagegen scheint im Kohl ebenso wie im Weizenblatt die Bildung der GS im Allantoinzyklus (KRUPKA und TOWERS 1959) möglich zu sein (vgl. Tab. 2). Dieser Weg dürfte allerdings kaum für die GS-Anreicherung nach Fütterung von Zitronensäure oder auch Ascorbinsäure in Frage kommen.

Zufütterung von Malonsäure führte zu einer Verminderung des KGS-Gehaltes. Daneben trat ein saures DNPH neu auf, das nicht weiter untersucht wurde, aber auf Grund seines Rf-Wertes in FM 1 (Rf-Wert 29) nicht mit Mesoxalsäure (Rf-Wert 16) identisch sein kann. Die Minderung der KGS durch Weinsäure kann kaum interpretiert werden, wenn auch die Parallele zur Wirkung der Malonsäure auffällig ist.

Auf welchen Wegen bei Zufütterung von Zitronen-, Äpfel- und Malonsäure der Hydroxy-BTS-Gehalt erhöht wird, läßt sich kaum andeuten; es mag ein loser Zusammenhang mit der Anhäufung von BTS und GS bestehen. Andererseits gewinnt die Hydroxy-BTS-Zunahme nach Fütterung von Ascorbinsäure dadurch größeres Interesse, als auch Zufütterung von Glukose und Galaktose in ähnlicher Richtung wirkte.

Der Versuch, durch diese Fütterungsversuche die postinfektionell auftretende Substanz B im Stoffwechsel in etwa zu lokalisieren, brachte nur bei Ascorbinsäure und Zitronensäure Erfolg. Hier traten mit relativ sehr geringer Intensität im Chromatogramm Zonen auf, deren Rf-Wert und Alkalifärbung den Verbindungen A und B glichen. Zufütterung von 3 % Glukose oder Galaktose ließ im FM 1 eine dem Rf-Wert nach der Substanz B entsprechend mit Alkali sich rot färbende Zone erkennen, welche noch im FM 2 einen anderen Wert zeigte. Es bleibt offen, ob es sich hier um eine der Substanz B verwandte Verbindung handelt. Auf Grund dieser Befunde läßt sich die post-

infektionelle Entstehung von B vorerst auch nicht andeutungsweise einordnen. Ihr Auftreten scheint an die Infektion mit biotrophen Parasiten gebunden zu sein, da sie nach Infektion mit echtem Mehltau auftritt, dagegen nicht nach einer solchen mit *Botrytis*. Hypothesen über ihre Entstehung im Stoffwechsel sollen erst im Zusammenhang mit einer näheren chemischen Charakterisierung besprochen werden.

b) Postinfektionelle Veränderungen an Enzymsystemen

Heitefuss (1957) machte durch Messung der O_2-Aufnahme unter dem Einfluß von Malonat und Fluorazetat wahrscheinlich, daß nach Infektion der Kohlkeimpflanzen mit *Peronospora parasitica* der vom Zitronensäurezyklus vermittelte Anteil der O_2-Aufnahme vermindert ist, d. h. die infektbedingte Intensivierung des Gaswechsels über andere Wege läuft. Ähnliches beobachteten auch Kiraly und Farkas (1957 a) an Weizen nach Infektion mit *Puccinia graminis tritici*, sie wiesen auch eine Umsteuerung der Endoxydation nach, derart, daß der Anteil der Cu-haltigen Enzyme an der O_2-Aufnahme im Laufe des infektiösen Prozesses zurückging.

Dies bestimmte uns, diese Untersuchungen durch Versuche über postinfektionelle Störungen der Endoxydation unter besonderer Berücksichtigung dieses Enzyms zu ergänzen und auch die Glyoxylsäure umsetzenden Enzymsysteme zu studieren (vgl. Kiraly und Farkas 1957 b).

1. Ascorbinsäureoxydase

Im Gegensatz zu dem ähnlichen Verhalten von infiziertem Weizen und Kohl gegenüber Inhibitoren des Zitronensäurezyklus entsprach die Reaktion der Ascorbinsäureoxydase in infizierten Kohlpflanzen nicht den Befunden von Kiraly und Farkas (1957 a) an rostkrankem Weizen.

Im Mittel von sechs Versuchen (je zwei Gefäße) war die Aktivität dieses Enzyms in infiziertem Gewebe um 69 % geringer als in nicht infiziertem.

2. Glyoxylsäurereduktase und Glycolsäureoxydase

Nach Kiraly und Farkas (1957) nimmt die Glycolsäureoxidaseaktivität nach Infektion von Weizen mit *Puccinia graminis tritici* ab. Da dieses Enzym zusammen mit Glyoxylsäurereduktase an der Respiration beteiligt sein könnte (Zelitch und Ochoa 1953), sollte auch an unserem Objekt nachgeprüft werden, ob etwa die parasitogen gesteigerte Atmung diesen Weg bevorzugt.

Der absolute Umsatz der Glycolsäureoxydase war großen Schwankungen unterworfen, die jedoch infizierte und nicht infizierte Pflanzen innerhalb eines Versuches in gleichem Maße betrafen. Unabhängig von diesen Schwankungen ließ sich jedoch im Mittel von sechs Versuchsreihen keine gesicherte Beeinflussung der Aktivität der Glyoxylsäurereduktase und der Glycolsäureoxydase

durch die Infektion nachweisen. Diese Fermentsysteme sind also bei Kohl nicht an postinfektionellen Veränderungen der Endoxydation beteiligt. Die Ursache der erwähnten Aktivitätsschwankungen ist auf Grund nachträglichen Vergleichs mit den Witterungsbedingungen an den Versuchstagen im unterschiedlichen Lichtgenuß der Pflanzen vor der Aufarbeitung zu suchen. Hohe Lichtmengen steigern die Glycolsäureoxydaseaktivität. Dementsprechend wäre bei besserer Belichtung ein höherer GS-Spiegel zu erwarten, falls die von diesem Enzym erzeugte GS nicht sofort wieder umgesetzt wird. Tatsächlich ist bei Belichtung die Reaktion von GS zu KGS zu ungunsten der ersteren verschoben (Seite 121). Falls GS bei Licht über die Glycolsäureoxydase gebildet werden sollte, wird sie offenbar nicht gespeichert, da die Höhe des GS-Spiegels bei Kohl von diesem Ferment unabhängig ist.

II. Zur Analyse der Inhibitorwirkung

a) Der Eingriff in den Ketosäurestoffwechsel

1. Die Befunde

HEITEFUSS (1957) und SIEBERT (1959) fanden nach Behandlung von Kohl bzw. Weizen mit den befallshemmenden Fermentinhibitoren Äthylurethan, Fluoressigsäure, SC und TSC unter anderem typische Veränderungen des Gehaltes der Pflanzen an organischen Säuren und Aminosäuren. Die enge metabole Verknüpfung dieser Stoffe mit Ketosäuren legte die Untersuchung dieser Metabolite unter ähnlichen Bedingungen nahe.

Tabelle 3

Die relative Veränderung des Ketosäurespiegels nach 48stündiger Vorbehandlung abgeschnittener Keimpflanzen mit Inhibitoren

Vorbehandlung	M	KGS	OES	GS	BTS	Hydroxy-BTS
a) bei Licht-Dunkel-Wechsel (16 : 8 Stunden)						
Wasser	—	1	1	1	1	1
Äthylurethan	10^{-1}	1	1	1	1	1
Fluoressigsäure	5×10^{-3}	0,5	0,5	2	1	1
Harnstoff	10^{-2}	1	1	1	1	1
Thioharnstoff	10^{-1}	1	1	1	3	1
SC	10^{-2}	10	2	6	4	4
TSC	10^{-1}	10	2	12—15	10	1
b) im Dauerdunkel						
SC	10^{-2}	5	2	3	5	1
TSC	10^{-1}	5	2	4	6	1

Behandlung mit Äthylurethan beeinflußt den Gehalt an Ketosäuren ebensowenig wie die Konzentration der Aminosäuren nach den Befunden von Heitefuss.

Fluoressigsäurebehandlung vermindert den Gehalt an KGS und OES. Zusammen mit der von Heitefuss beobachteten Anhäufung von Zitronensäure bei deutlicher Verminderung des Äpfelsäuregehaltes weist dies auf eine Blokkierung des Zitronensäurezyklus hin. Allerdings wäre eine Überprüfung dieser Beziehungen unter noch schärfer definierten Bedingungen nützlich, da Siebert (1959) an Weizen zwar eine Anhäufung von Zitronensäure, aber keine Verminderung der Äpfelsäure nach Fluoressigsäurebehandlung fand, sondern wie bei der Bernsteinsäure eine — allerdings sehr geringfügige — Zunahme. In diesem Zusammenhang fällt in unseren Versuchen auf, daß der GS-Spiegel neben der Anhäufung von Zitronensäure erhöht ist. Ob hier eine ursächliche Verknüpfung mit den ähnlichen Veränderungen des GS-Spiegels nach Zufütterung von Zitronensäure (Seite 124) besteht, kann nicht entschieden werden.

Vorbehandlung mit S C und T S C bewirkt dagegen, daß OES, KGS, BTS und GS in vervielfachter Menge gefunden werden (Tab. 3 a).

Das Ausmaß der relativen Anhäufung ist von den Lichtverhältnissen abhängig. In der Mitte der Lichtperiode eines normalen Hell-Dunkel-Wechsels (16 : 8 Stunden) (Tab. 3 a) sind KGS und GS, nach SC-Behandlung auch Hydroxy-BTS, nach TSC-Behandlung BTS viel stärker angereichert als nach Vorbehandlung im Dauerdunkel (Tab. 3 a). Nach SC-Behandlung ist BTS im Licht-Dunkel-Wechsel etwas geringer angehäuft als im Dauerdunkel.

Wurde bereits kurze Zeit nach dem Einstellen in die Carbazidlösungen aufgearbeitet, so zeigte sich an belichteten Pflanzen der erste nicht quantifizierbare Anstieg von BTS und KGS nach 2 Stunden, von GS nach 3 bis 4 Stunden. Im Dunkel ist der Anstieg erst nach drei- bis vierfacher Zeit festzustellen.

Da eine Vorbehandlung mit äquivalenten Mengen Harnstoff bzw. Thioharnstoff völlig andere Befunde gab als die SC- bzw. TSC-Behandlung (Tab. 3 a), können die beobachteten Veränderungen nicht der Harnstoffgruppierung im Hemmstoffmolekül zugeschrieben werden, sondern überwiegend der Hydrazinkomponente. Offen bleibt die Frage, ob diese unmittelbar durch Abfangen der Ketosäuren aus den Stoffwechselzyklen wirkt oder mittelbar durch Umleitung bestimmter Stoffwechselwege. Wir versuchten, beide Möglichkeiten zu studieren.

2. Zur Deutung

Eine u n m i t t e l b a r e A b f a n g w i r k u n g konnte durch papierchromatographischen Nachweis der Ketosäure-Thiosemicarbazone (TSC-one) im Pflanzenextrakt eindeutig gezeigt werden (Nielsen 1960). Nach einer groben Schätzung finden sich in 1 g frischer Pflanzenmasse nach 48stündiger TSC-Behandlung etwa 0,4 mg KGS-TSC-on, 0,6 mg BTS-TSC-on, 0,7 mg

GS-TSC-on, sowie etwa 0,4 mg freies TSC und etwa 2 mg TSC-one von Aldehyden und nicht sauren Ketonen, welche wir nicht näher untersuchten[1]).

Da wir zur Zeit freie und als Carbazone gebundene, im Gewebe vorkommende Ketosäuren noch nicht trennen können, läßt sich nicht entscheiden, ob nach Vorbehandlung noch freie Ketosäuren zusätzlich vorhanden sind. In Gegenwart von freiem TSC müßte auch bei wasserlöslichen TSC-onen das Gleichgewicht zuungunsten der freien Säuren verschoben sein, ohne daß letztere vollkommen dem Stoffwechsel entzogen wären. Für SC dürfte ähnliches gelten.

Wird die Anhäufung unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, so fällt auf, daß sie für einzelne Ketosäuren nach SC- oder TSC-Vorbehandlung nicht gleich hoch ist. Vor allem im Anhäufungsgrad der GS und BTS unterscheiden sich SC- und TSC-Behandlung wesentlich. Es ergibt sich daher die Frage, ob dies als Konzentrationseffekt oder als spezifischer Unterschied in der Wirkungsweise der beiden Inhibitoren zu werten ist.

HEITEFUSS zieht bei der Besprechung ähnlicher Unterschiede in der Aminosäureanhäufung in erster Linie die Spezifität der Wirkstoffe heran.

Die recht geringe Wirkung des Thioharnstoffs in unseren Versuchen unterstützt die Deutung, daß unterschiedliche BTS- und GS-Spiegel durch die verschieden angewandten Konzentrationen von SC und TSC bedingt sind. In diesem Fall müßte nach der SC-Behandlung mehr freie BTS und GS in der Pflanze zur Verfügung stehen, ohne daß wir dies nachweisen können.

In diese Vorstellung paßt anscheinend nicht hinein, daß KGS und OES, unbeschadet des Konzentrationsunterschiedes nach SC- und TSC-Behandlung, im gleichen Maße angehäuft werden. Die geringere Abhängigkeit der Anhäufung vom Licht weist vielleicht schon darauf hin, daß hier ein anderer Wirkungsmechanismus tätig wird als bei BTS und GS. Auch wäre denkbar, daß auf Grund größerer Affinität zu den Carbaziden die Dicarbonsäuren bereits durch die geringere Konzentration des SC in hohem Grade abgefangen würden. Da es sich um die dem Tricarbonsäurezyklus angehörigen Ketosäuren handelt, ist bedeutungsvoll, daß HEITEFUSS eine annähernd gleich starke Abnahme der Zitronensäure nach SC- und TSC-Vorbehandlung unbeschadet der Wirkstoffkonzentration gefunden hat. Zusammengefaßt deuten diese Befunde auf eine etwa gleich starke Blockierung des Zitronensäurezyklus durch beide Inhibitoren hin.

Die Anhäufung der Hydroxy-BTS, die nur bei belichteten Pflanzen auftritt, scheint eine spezifische Wirkung der SC-Vorbehandlung zu sein und soll später erörtert werden.

---

[1]) Um nach Möglichkeit den Verdacht auszuschließen, daß die Ketosäure-TSC-one aus freiem TSC sekundär während der Aufarbeitung entstehen, wurden die zu untersuchenden Blätter 30 Minuten vor der Homogenisierung mit einer wäßrigen Lösung von je 5×10^{-1} mol 1-Butanon und Aceton infiltriert, in der Annahme, daß diese Ketone freies TSC abbinden, ehe im Wasser Acetongemisch homogenisiert und weiter aufgearbeitet wurde. Die chromatographische Analyse ergab eine deutliche Zunahme der nicht sauren TSC-one bei gleichzeitiger Abnahme, aber nicht völligem Verschwinden des freien TSC, ließ aber keine Konzentrationsänderungen der Ketosäure-TSC-one erkennen. Wir halten dies für einen Beweis ihrer primären Entstehung.

Die Anhäufung von BTS nach Vorbehandlung mit Thioharnstoff weist ebenfalls darauf hin, daß eine Speicherung als Carbazon nicht die einzige Ursache der Ketosäureanhäufung sein kann (Tab. 3 a). Die Thioharnstoffkonfiguration muß ebenfalls, wenigstens teilweise, in dieser Richtung wirken. Hier zeigt sich eine Parallele zu der Beobachtung von SIJPESTEIJN und VAN DER KERK (1956), daß im Medium verschiedener Pilzkulturen unter Einwirkung von Natrium-Dimethyldithiocarbamat BTS angehäuft wird. Die Autoren deuten dies als Folge einer Hemmung des Koenzyms A-SH durch die schwefelhaltigen Inhibitoren, wodurch die Tätigkeit der Pyruvatoxydase behindert wird. Dies scheint wahrscheinlicher als die Annahme einer chelatischen Hemmung schwermetallabhängiger Enzymsysteme, deren wenige unmittelbar an der BTS angreifen. Ein Teil der höheren BTS- und vielleicht auch GS-Anhäufung nach TSC-Behandlung, verglichen mit SC-Vorbehandlung, könnte somit einer Schwefelwirkung zugeschrieben werden. Allerdings dürfte der oben erwähnte Konzentrationseffekt von diesem Unterschied unabhängig sein.

3. Eine vergleichende Betrachtung der Keto- und Aminosäureanhäufung

gibt einen anderen Anknüpfungspunkt für die Diskussion. Obgleich die hier mitgeteilten Ergebnisse und die Beobachtungen von HEITEFUSS über die Aminosäureanhäufung nach SC- und TSC-Behandlung in verschiedenen Jahren und daher nicht unter identischen Umwelteinflüssen gewonnen wurden, scheint ein solcher Vergleich erlaubt zu sein, weil wir erstens in Stichproben parallel zu den Ketosäurebestimmungen qualitativ ähnliche Veränderungen der Aminosäuren feststellten wie HEITEFUSS und zweitens die zu vergleichenden Ergebnisse Mittelwerte aus unabhängigen, sehr gut übereinstimmenden Versuchsreihen sind.

Der Vergleich erstreckt sich vorerst nur auf Größenordnung und Richtung der Veränderungen, solange ihre Quantifizierung am gleichen Material nicht durchgeführt ist.

Vorbehandlung mit SC und TSC erhöht in einigen Fällen den Gehalt strukturähnlicher Amino- und Ketosäuren in ähnlicher Weise, so vor allem bei GS und Glycin nach TSC- und SC-Behandlung, bei BTS und Alanin nur nach TSC-Vorbehandlung und andeutungsweise bei Hydroxy-BTS und Serin nur nach SC-Behandlung.

Dagegen steht bei den Dicarbonsäuren nach Vorbehandlung der sehr starken Erhöhung des Ketosäurespiegels keine Zunahme der entsprechenden Aminosäure gegenüber, im Fall von KGS nach TSC sogar eine Abnahme der Glutaminsäure.

Die Anreicherung der Aminosäuren läßt sich daher allein aus der Veränderung des Ketosäurespiegels nicht befriedigend allgemein deuten. Eine differenzierte Deutung setzt die Untersuchung der Beeinflussung des Transaminasesystems durch SC und TSC voraus.

Eine solche Beeinflussung sieht HEITEFUSS in erster Linie als Ursache der Zunahme zahlreicher Aminosäuren an, da er Bedenken hatte, die seinerzeit

noch nicht nachgewiesene Abbindung der Ketosäuren durch Carbazide allein für die Störungen im Bereich der Aminosäuren verantwortlich zu machen. Er diskutierte die Hemmung der Transaminase durch Blockierung der Aldehydgruppe des Pyridoxalphosphats (Pyr-Ph). Auch CRUICKSHANK und ISHERWOOD (1958) erklären die starke Hemmung der Alanin-KGS-Transaminase des Weizenblattes als Abbindung des Coenzyms durch SC. Die Hemmung der Transaminasen des Schweineherzens und verschiedener Bakterien durch aromatische Hydrazide, speziell Isonicotinsäurehydrazid wird ebenso gedeutet (HICKS und CYMERMAN-CRAIG 1957, YOUATT 1958, HICKS 1959).

Auch in unseren Versuchen wird durch 48stündiges Einstellen der Pflanze in 10^{-2} M SC bzw. 10^{-1} M TSC die Transaminaseaktivität um 84 bzw. 93 % gehemmt. Träfe der oben skizzierte Wirkungsmechanismus zu, so müßte eine Zugabe von Pyr.-Ph. eine reversible Hemmung rückgängig machen. In Vorversuchen wurde durch eine zusätzliche Pyr.-Ph.-Gabe die Transaminaseaktivität im Extrakt unbehandelter Pflanzen nicht erhöht. In Versuchen mit Rohenzym aus Pflanzen nach 48stündigem Einstellen in SC bzw. TSC wird die starke Verminderung der Aktivität durch die Vorbehandlung tatsächlich durch Zugabe von 25 bis 125 µg je Warburg-Ansatz zu einem großen Teil aufgehoben.

Tabelle 4

Die Transaminasehemmung im Preßsaft nach Vorbehandlung der Pflanzen mit SC und TSC

Vorbehandlung der Pflanzen	0	25	125	0	25	125
	µg Pyridoxalphosphat je Gefäß					
	Glutaminsäurebildung mM/Std./0,05 ml Rohenzym			Relative Hemmung in %		
keine	6,65			0		
SC 10^{-2} M	1,13	3,20	3,87	84 ± 2	53 ± 5	42 ± 2
TSC 10^{-1} M	0,47	1,80	2,60	93 ± 1	73 ± 3	61 ± 1

Noch höhere Pyr.-Ph.-Gaben steigern die Aktivität nicht weiter. Es kann also die Aktivität des Rohenzyms unbehandelter Pflanzen nicht erreicht werden.

Höchstwahrscheinlich greifen daher die Carbazide an unserem Objekt durch Blockierung des Coenzyms in die Transaminasereaktion ein. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß die Aktivität des gehemmten Enzymansatzes durch Erhöhung der KGS-Konzentration nicht gesteigert werden kann, selbst wenn diese auf molarer Basis die SC- bzw. TSC-Dosis übersteigt.

Eine volle Reaktivierung des durch Vorbehandlung der Pflanze gehemmten Enzymsystems wäre allerdings nur unter der Voraussetzung denkbar, daß entweder die Carbazonbindung durch zugesetztes Pyr.-Ph. aufgehoben, oder das abgebundene Pyr.-Ph.-Carbazon gegen zugesetztes Pyr.-Ph. ausgetauscht wird. Ersteres erscheint unwahrscheinlich, da eine sehr hohe Affinität des SC

bzw. TSC zu Pyr.-Ph. anzunehmen ist. Letzteres hat zur Voraussetung, daß Co- und Apoenzym sich relativ leicht trennen.

Cruickshank und Isherwood (1958) nehmen eine sehr feste Bindung zwischen Co- und Apoenzym der Alanin-KGS-Transaminase an, da sie sich im Gegensatz zur Glutaminsäure-Asparaginsäure-Transaminase durch Dialyse nicht lösen ließ. Ähnliches gilt auch für Transaminasen aus tierischen Geweben oder Bakterien. Für den Kohl scheint gleiches zuzutreffen.

Nach 20stündiger Dialyse einer vorgereinigten Enzymlösung (Enzymrohlösung unbehandelter Pflanzen im Verhältnis 1 : 3 mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,7 versetzt, Trübung bei 1 bis 2 °C abzentrifugiert) bei 1 bis 2 °C gegen 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,7 waren noch 66 % der Ausgangsaktivität vorhanden, durch Pyr.-Ph.-Zusatz konnte die Aktivität nur auf 72 % erhöht werden.

Einwirkung äquimolarer Gaben von SC und TSC auf die Transaminase der Enzymrohlösung gesunder, unbehandelter Pflanzen führte zu etwa gleich starker Hemmung (Tab. 5). Der Hemmwert von $1{,}8 \times 10^{-3}$ M SC entsprach recht gut der durch 2×10^{-3} M SC bei Weizentransaminase gefundenen Hemmung (Cruickshank und Isherwood 1958). Überschuß von KGS hob die Hemmung ebensowenig auf wie bei Ansätzen aus vorbehandelten Pflanzen. Ein Angebot an Ketosäure kann also offensichtlich die Pyr.-Ph.-Carbazonbindung nicht leicht wieder lösen. Zugabe von 25 µg Pyr.-Ph. verminderte den Hemmwert nicht. Es bleibt offen, wie höhere Cofermentzusätze wirken, deren Konzentration die des freien SC bzw. TSC übersteigt. Alle Beobachtungen deuten auf eine große Affinität des Pyr.-Ph. zu Carbazid, welche vielleicht die zu Ketosäuren im Zellmilieu übersteigen könnte.

Tabelle 5

Hemmung der Transaminase unbehandelter Pflanzen durch Zusatz von SC und TSC

(Mittel von zwei Versuchsreihen in Prozent des Kontrollwertes)

Molare Konzentration	SC	TSC
$4{,}5 \times 10^{-4}$	21	20
$1{,}8 \times 10^{-3}$	60	59
$4{,}5 \times 10^{-3}$	83	85

Es wäre nun zu prüfen, wie die nachgewiesene Hemmung der Transaminase im einzelnen zur Deutung der Anreicherung von Amino- und Ketosäuren herangezogen werden kann. Unterstellen wir dabei, daß eine Reihe verschiedener Transaminasesysteme in der Pflanze wirksam sind und daß diese in unterschiedlichem Maße durch SC oder TSC gehemmt werden können. Mit diesen Inhibitoren liegen zwar keine einschlägigen Untersuchungen vor, jedoch ist eine differenzierende Hemmung des Isonicotinsäurehydrazids auf die Transaminierung verschiedener Aminosäuren bei Bakterien nachgewiesen

(YOUATT 1958). Dies könnte eine unterschiedliche Anreicherung von Aminosäuren erklären, gleichgültig ob die in den abgeschnittenen Keimlingen während der Vorbehandlung aus dem Eiweißabbau entstehenden Aminosäuren durch Hemmung des Transaminasesystems oder durch Abfangen benötigter Ketosäuren aufgestaut werden. Allerdings lassen sich aus dem Vergleich unserer Ergebnisse mit den Werten von HEITEFUSS für Aminosäuren nur sehr bedingt Anhaltspunkte für eine Gleichgewichtsverschiebung innerhalb der Transaminasesysteme gewinnen. Nur nach TSC-Behandlung steht eine Erhöhung des KGS-Spiegels einer Erniedrigung des Glutaminsäuregehaltes gegenüber, die als Verlagerung des Transaminasegleichgewichtes gedeutet werden könnte, wenn nicht die anderen Reaktionsteilnehmer BTS und Alanin beide kräftig angereichert wären. Nun ist zwar unter den gegebenen Bedingungen nicht mit einer normalen Gleichgewichtslage des Transaminasesystems zu rechnen, da die angehäuften Ketosäuren als TSC-one bzw. SC-one vermutlich weitgehend dem Reaktionsgleichgewicht entzogen sind; aber auch unter dieser Annahme läßt sich eine Anreicherung beider, auf einer Seite des Gleichgewichtes stehenden Reaktionsteilnehmer schwer deuten. Es hat also vielmehr den Anschein, als ob durch die Transaminasehemmung und die dadurch bedingte Ausschaltung eines normalerweise wohl bevorzugt begangenen Stoffwechselweges der Spiegel aller oder doch der meisten an dieser Reaktion beteiligten Stoffe angehoben ist. Vielleicht ist dies damit zu erklären, daß sowohl der Ketosäurestoffwechsel als auch der Aminosäurestoffwechsel unter diesen pathologischen Bedingungen andere Wege mit geringerer Umsatzgeschwindigkeit geht und höhere Konzentration der Reaktionspartner bedingt. Es wäre müßig, hierüber weiter zu diskutieren, ehe eingehendere quantitative Untersuchungen durchgeführt sind.

b) Die Hemmung von Oxydasesystemen

Aus den auf S. 125 erwähnten Gründen wurden die vielleicht als Wege pathologischer Atmungssteigerung in Frage kommenden Systeme studiert, welche an Ascorbinsäure und an der gerade nach SC- und TSC-Behandlung stark anfallenden Glyoxylsäure angreifen. Im Gegensatz zum postinfektionellen Status ist die Atmungsintensität nach Vorbehandlung mit TSC und SC allerdings vermindert (HEITEFUSS 1957).

1. Die „Ascorbinsäure-Oxydase"-Aktivität[1]) war nach 48stündiger Vorbehandlung der Pflanzen mit Aethylurethan und Fluoracetat unverändert. Auch die Vorgabe von SC übte keinen Einfluß aus, während TSC-Vorbehandlung die Aktivität stark herabsetzte. Vorbehandlung mit Harnstoff entsprechender Molarität zeigte keine Wirkung, Thioharnstoff wirkte in gleichem Ausmaß wie äquimolare TSC-Mengen: Der Sauerstoff-

[1]) Sinngemäß hätte hier, wie an früherer Stelle überhaupt, besser von „Ascorbinsäure" bzw. „Glykolsäure oxydierenden Systemen" statt von Ascorbinsäure- bzw. Glykolsäureoxydasen gesprochen werden sollen. Dieser Ausdruck ist nur der Einfachheit halber benutzt worden.

verbrauch von 0,2 ml Rohenzymlösung war im Mittel von 5 Versuchen durch Vorbehandlung mit 10^{-1} M Thioharnstoff um 80,5 %, durch 10^{-1} M TSC um 84,0 % gehemmt. Dies deutet darauf hin, daß die Wirkung des TSC ebenso auf Chelierung des aktiven Cu beruht, wie dies für den Thioharnstoffeffekt auf enzymatische und nicht enzymatische Ascorbinsäureoxydation anzunehmen ist (Mayer 1957, Kawerau und Fearon 1944).

Die Identität der Thioharnstoff- und TSC-Wirkung zeigt sich auch bei Zugabe dieser Stoffe zur Rohenzymlösung gesunder unbehandelter Pflanzen: die konzentrationsabhängige Hemmung ist etwa gleich groß (Tab. 6). SC hemmt das Enzym weder nach Vorbehandlung der Pflanzen noch bei Zugabe zum Rohenzym, während TSC im ersten Falle die Aktivität viel stärker beeinträchtigt als im zweiten. Diese Unterschiede können vielleicht die an Weizen (Siebert 1959) gemachte Beobachtung erklären, daß Vorbehandlung mit TSC die Empfindlichkeit des „Atmungssystems" gegen spätere TSC-Gaben im Gegensatz zur SC-Vorbehandlung spezifisch herabsetzt.

Tabelle 6

Hemmung der „Ascorbinsäureoxydase" durch Zusatz von Thioharnstoff und TSC

(Mittel aus vier Versuchsreihen)

Molare Konzentration	% Hemmung des O_2-Verbrauchs von 0,2 ml Enzymrohlösung durch	
	Thioharnstoff	TSC
$1{,}8 \times 10^{-2}$	7,0	5,0
$4{,}5 \times 10^{-2}$	18,0	17,0
$9{,}0 \times 10^{-2}$	26,5	26,5
$1{,}8 \times 10^{-1}$	36,0	42,0*)

*) $1{,}8 \times 10^{-1}$ M TSC stellt eine gesättigte Lösung dar.

Ebenso könnten sie zur Deutung der auffällig starken Depression der Sauerstoffaufnahme von Kohl nach TSC-Vorbehandlung (Heitefuss 1957) beitragen. Ferner ergibt sich vielleicht eine Querverbindung zu dem Befund, daß nach SC-Vorbehandlung im Gegensatz zu TSC in belichteten Pflanzen die Hydroxy-BTS zunimmt (S. 127). Berücksichtigen wir, daß diese Säure auch nach Zugabe von Ascorbinsäure angereichert werden kann (S. 124) und unterstellen, daß bei Licht eine intensivere Ascorbinsäuresynthese und -umsetzung erfolgt (vgl. Åberg 1958), könnte der Unterschied des Hydroxy-BTS-Spiegels nach SC- und TSC-Vorbehandlung auf die Hemmung eines ersten Schrittes der Ascorbinsäureoxydation durch TSC zurückgeführt werden. Die Überprüfung dieser Hypothese mußte unterbleiben, da das in der Pflanze vorhandene TSC die quantitative Ascorbinsäurebestimmung stört. So erübrigt sich eine weitere Diskussion um so mehr, als auch kein Zusammenhang zwischen infektogener Atmungssteigerung und „Ascorbinsäure-Oxydase"-Aktivität besteht (S. 125).

2. Glyoxylsäure-Reduktase und „Glykolsäure-Oxydase" werden in ihrer Aktivität durch 48stündige Vorbehandlung der Pflanzen mit Äthylurethan, Fluoressigsäure, Harnstoff und Thioharnstoff nicht beeinträchtigt.

Durch TSC-Vorbehandlung wurde die Aktivität der Glyoxylsäurereduktase im Mittel von 4 Versuchsreihen nur sehr schwach, nämlich um 13,5 %, gehemmt, die geringere Vorbehandlungsdosis von SC war unwirksam. Da jedoch Thioharnstoffvorbehandlung wirkungslos ist, kann die geringe TSC-Wirkung nur auf einer schwachen Affinität der 5-Aminogruppe zu dem Enzym beruhen; dem entspricht, daß ZELITCH (1955) dieses nur durch sehr hohe SC-Konzentrationen hemmen konnte.

Die Aktivität der „Glykolsäureoxydase" ist dagegen nach Vorbehandlung der Pflanzen mit SC und TSC im gleichen Maße (im Mittel von 7 Versuchsreihen um 34 bzw. 37 %) vermindert, obgleich, wie in allen Vorbehandlungsversuchen, mit 10^{-2} M SC aber 10^{-1} M TSC gearbeitet wurde. Um vielleicht den Einfluß der unterschiedlichen Konzentration auszuschalten, wurden geringer dosierte TSC-Vorbehandlungen durchgeführt. 5×10^{-2} TSC bewirkte eine Hemmung von etwa 17 %, die der SC-Anwendung entsprechende Gabe von 10^{-2} M dagegen gar keine Hemmung.

Eine Deutung der ähnlichen Wirkung unterschiedlicher SC- und TSC-Konzentration ergibt sich vielleicht aus der Größe der Hemmung des Rohenzyms unbehandelter Pflanzen durch Zugabe von Harnstoff, Thioharnstoff, SC und TSC (Tab. 7)[1]).

Tabelle 7

Beeinflussung der „Glykolsäureoxydase"-Aktivität durch Zusätze

Molare Konzentration	Beeinflussung des O_2-Verbrauchs von 0,2 ml Enzymrohlösung durch			
	Harnstoff	SC	Thioharnstoff	TSC**)
9×10^{-3}	0	— 6	0	+ 7
$1{,}8 \times 10^{-2}$	0	—14	0	+ 10
$4{,}5 \times 10^{-2}$	0	—23	— 7	— 26
9×10^{-2}	0	—30	—21	— 68
$1{,}8 \times 10^{-1}$	0	—48	—60	—100*)

*) $1{,}8 \times 10^{-1}$ M TSC stellt eine gesättigte Lösung dar.

**) In Prozent des Umsatzes der Kontrollzusätze.

Da Harnstoff nicht wirkt, muß die konzentrationsabhängige SC-Hemmung einer Reaktion der 5-Aminogruppe zugeschrieben werden. Allerdings ist ihr Wirkungsgrad im Verhältnis zu der sehr ausgeprägten Hydroxylaminhemmung (vgl. ZELITCH 1955) gering und liegt unter der Aktivitätsminderung des Rohenzyms in einer mit SC vorbehandelten Pflanze. Die Hemmung

[1]) Entsprechende Untersuchungen mit der Glyoxylsäurereduktase unterblieben unter der Annahme, daß die Abbindung des zugesetzten Substrats durch die Carbazide stören könnte.

durch Thioharnstoff setzt nach Überschreiten eines Schwellenwertes sehr steil ein und beruht wohl auf der Wirkung der Thiogruppe.

Für TSC bietet das Enzymsystem also offenbar zwei Angriffspunkte: über die 5-Amino- und die Thiogruppe. Daß die Hemmwerte höherer Konzentrationen von TSC (Tab. 7) sich annähernd additiv aus den Hemmungen durch SC und Thioharnstoff ergeben, sei erwähnt, ohne die Bedenken gegen eine solche Berechnung zu unterdrücken. Auffällig ist aber auch, daß SC in niedrigen Konzentrationen schwach hemmt, TSC dagegen die Aktivität ein wenig steigert. An gereinigten Enzympräparaten ist eine Aktivitätssteigerung durch Cyanid bekannt, die auf komplexe Bindung von Metallionen zurückgeführt wird (Zelitch 1955). Es wäre denkbar, daß der geringe Effekt von TSC auf gleichsinnig chelierende Wirkung hinweist, welche andersartige Wirkungen der 5-Aminogruppe kompensiert, während in höheren Konzentrationen die aus der Thioharnstoffwirkung abzuleitende Bedeutung der Thiogruppe die Hemmwirkung der 5-Aminogruppe verstärkt. Die Möglichkeit, daß es sich hier, ähnlich wie bei Dithiokarbamaten, um eine Affinität zu schwefelhaltigen Gruppen des Enzyms handelt, sei angesichts der geringen Menge an Untersuchungsmaterial nicht näher erörtert.

Da wir nur mit Rohpräparaten arbeiteten, muß allerdings die Frage aufgeworfen werden, inwieweit bei der beobachteten Wirkung von SC und TSC Folge- und Nebenreaktionen möglich sind, welche gerade bei diesem Ferment unter Einbeziehung weiterer katalytischer Oxydationen, auch solche an chinoiden Systemen, diskutiert werden (Zelitch und Ochoa 1953).

Ungeklärt bleibt auch die Frage, ob die eben diskutierten „in vitro"-Wirkungen der Inhibitoren mit der nach Vorbehandlung der Pflanzen erzielten Hemmung zu vergleichen sind. Da Thioharnstoffvorbehandlung die Fermentaktivität nicht beeinflußt, könnte geschlossen werden, daß unter diesen Bedingungen die Thiogruppe an Enzymrohlösung behandelter Pflanzen nicht wirken kann. Der Wirkungsunterschied gleich konzentrierter SC- und TSC-Lösungen bei der Vorbehandlung läßt aber die Deutung offen, daß sich bei niedrigen Konzentrationen zwei verschiedene Wirkungsweisen des TSC kompensieren und dementsprechend erst eine höhere TSC-Dosis gleich wirkt wie eine niedrigere von SC.

Unbeschadet dieser offenen Fragen erscheint aber der Schluß berechtigt, daß weder die geringfügige Minderung der Glyoxylsäure-Reduktase-Aktivität durch TSC noch die geschilderte Beeinflussung des Glycolsäure oxydierenden Systems eine Erklärungsmöglichkeit für die Anhäufung von C_2-Körpern nach (Thio-) Semicarbazidbehandlung bietet.

III. Besprechung der Ergebnisse

Wir versuchten einerseits, die Veränderungen von Teilreaktionen infizierter Pflanzen aufzuklären, andererseits die Angriffspunkte bestimmter Hemmstoffe näher zu ermitteln, um die für obligate Parasiten lebensnotwendige Gliederung im Stoffwechsel näher kennenzulernen.

Auf Grund des offensichtlich völlig verschiedenen Wirkungsmechanismus der einzelnen Hemmstoffe seien diese gesondert behandelt:

1. Die Versuche mit Äthylurethan brachten keinerlei Veränderungen im Gehalt an Ketosäuren oder der Enzymaktivitäten. Da auch die von HEITEFUSS beobachteten Veränderungen nicht so groß sind, daß man sie für eine befriedigende Deutung heranziehen könnte, bleibt die Ursache der infekthemmenden Wirkung dieser Verbindung ungeklärt.

2. Fluoressigsäure behandlung beeinflußt nur Glieder des Zitronensäurezyklus und die Glyoxylsäure, die jedoch mit jenem über den Glyoxylatzyklus in enge Verbindung gebracht werden könnte. Dies fügt sich sehr gut in das von HEITEFUSS auf Grund der starken Zunahme der Zitronensäure, der Abnahme der Apfelsäure und des O_2-Verbrauchs entworfene Bild ein, nach dem „die entscheidende Beeinflussung der Wirtspflanzen durch Fluoressigsäure in dem Eingriff in den Tricarbonsäurezyklus und damit in die oxydativen Vorgänge der Pflanze gesehen werden kann".

3. Die Deutung der Effekte von Carbaziden (SC und TSC) wird dadurch erschwert, daß SC und TSC in verschieden hohen Konzentrationen, 10^{-2} bzw. 10^{-1} M angewandt werden mußten, um die Ergebnisse mit denen von HEITEFUSS (1957) vergleichen zu können.

Die folgende Aufstellung aller bisher beobachteten Veränderungen (vgl. HEITEFUSS 1957) mag zeigen, daß dieser Konzentrationsunterschied zwar die Stärke der Ausprägung einiger Wirkungen bestimmt, jedoch kaum ein grundsätzlicher Unterschied in der Wirkungsweise von SC und TSC besteht, wenn auch die Thiogruppe im einen oder anderen Fall modifizierend oder zusätzlich wirken kann.

Beide Carbazide erhöhen den Aminosäurespiegel und den Ketosäuregehalt, vermindern aber die Atmungsintensität, den Gehalt an Zucker und Zitronensäure und die Aktivität des Glycolsäure oxydierenden Systems und die der Alanin-Ketoglutarsäure-Transaminase.

Trotz der unterschiedlichen Anwendungskonzentration von SC und TSC sind die genannten Wirkungen nur in einigen Fällen und in relativ geringem Grade bei TSC-Vorbehandlung stärker ausgeprägt als bei SC-Vorbehandlung.

In den wenigen Fällen, in denen nur eins der beiden Carbazide eine Wirkung zeigte, erscheint ein Zusammenhang mit der Beeinflussung des Infektionsverlaufes unwahrscheinlich. So wurde die „Ascorbinsäureoxydase" nur durch TSC zu 84 % über die Thiogruppe gehemmt, während SC unwirksam war. Thioharnstoff hemmte dieses Enzym in gleichem Maße, beeinflußte jedoch die Infektion nicht; die „Ascorbinsäureoxydase"-Hemmung durch TSC kann daher nicht die Ursache der befallshemmenden Wirkung sein. Im Gegensatz zu KIRALY und FARKAS (1957 a) muß angenommen werden, daß „Ascorbinsäureoxydase" für den Infektionsverlauf bei unserem Objekt keine wesentliche Rolle spielt.

In dem nur durch SC erhöhten Äpfelsäuregehalt kann ebensowenig wie in der durch TSC schwach gehemmten Glyoxylsäurereduktase die Ursache für die Unterdrückung der Infektion gesehen werden. Diese muß vielmehr in einer, den beiden Carbaziden gemeinsamen Reaktion begründet sein; allein

schon die oben aufgeführten gemeinsamen Wirkungen auf den Stoffwechsel legen dies nahe.

Daraus ergibt sich zwangsläufig die Frage: Welcher der zahlreichen Veränderungen nach SC- und TSC-Behandlung könnte ein infektionshemmender Einfluß zugeschrieben werden?

Die Gegenüberstellung unserer Ergebnisse mit den Befunden von Heitefuss (vgl. S. 129) ergibt, daß sich der größte Teil der von uns beobachteten Veränderungen in zwei Reaktionsgruppen einordnen läßt:

1. Transaminasen können durch SC und TSC gehemmt werden und dadurch — vielleicht zusammen mit der Festlegung der Ketosäuren — zur Anhäufung von Aminosäuren führen;
2. Ketosäuren und Aldehyde können als SC-one bzw. TSC-one abgebunden und teilweise dem Stoffwechsel entzogen werden mit den möglichen Folgen: verminderte Atmung, abnehmender Zitronensäuregehalt, abnehmender Zuckergehalt (vgl. Heitefuss).

Da SC- und TSC-Behandlung in der gleichen Weise die Infektion hemmt, bei ersterer aber viel weniger Aminosäuren angereichert werden, kann die Erhöhung des Aminosäurespiegels allein wohl kaum für die Befallshemmung durch beide Wirkstoffe verantwortlich gemacht werden. Inwieweit diese Wirkung in der Hemmung der Transaminasen begründet ist, läßt sich nicht eindeutig entscheiden. Heitefuss konnte durch Hydroxylamin, das ebenfalls pyridoxalphosphatgesteuerte Enzyme wirksam hemmt (Cruickshank und Isherwood 1958, Davison 1956), keine Veränderung im normalen Verlauf der Infektion erzwingen. Leider war es uns aus äußeren Gründen nicht möglich, bisher zu untersuchen, ob äquimolare Vorbehandlungen mit SC und TSC die Transaminase im gleichen Grade hemmen. Wäre dies der Fall, würde die Bedeutung dieses und anderer pyridoxalphosphatabhängiger Enzymsysteme für die Infektionshemmung zumindest unwahrscheinlich.

Da die bisherigen Ergebnisse dagegen sprechen, daß die „Glycolsäureoxydase" in unserem Fall die ihr von anderer Seite zugeschriebene Rolle in der infektogenen Atmung spielt, läßt sich nicht sagen, ob die Hemmung dieses Systems eine Bedeutung für die Unterdrückung der Infektion hat. Die Bedeutung einzelner Nebenreaktionen für die Hemmung dieses Systems darf nicht übersehen werden (siehe S. 135). Daher scheint uns der auf Seite 137 kurz erwähnte Einzelversuch interessant zu sein, in dem TSC-Vorbehandlung in gleicher Konzentration wie SC (10^{-2} M) keine Hemmung der „Glycolsäureoxydase" gegenüber einer solchen von 35 % durch SC mehr brachte. Durch diese TSC-Konzentration wurde die Infektion ebenfalls nicht mehr gehemmt. Es bedarf weiterer Versuche, um einen deutlichen Zusammenhang zwischen Hemmung des Enzyms und Einfluß auf die Infektion aufzuklären.

Es ist noch nicht möglich, einzelne der unter 2 (S. 127) zusammengefaßten Abbindungsreaktionen und ihrer Folgen mit der Hemmung des Parasiten unmittelbar in Beziehung zu bringen. Diese Reaktionen geben aber, geschlossen betrachtet, das Bild eines verlangsamten Energieumsatzes eines

lebenden Mangelsubstrates, das durch stockende Nachlieferung oder gänzlichen Ausfall eines für den Pilz wichtigen Intermediärproduktes seine Entwicklung nicht mehr gestattet.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Wirkung von SC und TSC allein oder überwiegend auf die Reaktionsmöglichkeiten der 5-Aminogruppen zurückführen.

Die dadurch bestimmte „Abfangreaktion" erfaßt spezifische und unspezifische intermediäre Carbonylverbindungen. Wenn die nach Infektion neu auftretenden Ketosäuren eine wichtige Rolle im Stoffwechsel spielen sollten, könnte ihre Abbindung den Verlauf der Infektion beeinflussen.

Eine Abbindung von Pyridoxalphosphat beeinträchtigt nicht nur die Transaminaseaktivität sondern auch andere Enzymsysteme. Unter anderem könnte man im Zusammenhang mit infektiösen Prozessen an das Serin und Indol zu Tryptophan kondensierende Enzym (GREENBERG und GALSTON 1959) denken, weil dieses einen Schritt der Synthese von β-Indolessigsäure steuert. Dieser Schritt scheint aber nach neueren Untersuchungen an Rostpilzen (SHAW und HAWKINS 1958, DALY und INMAN 1958) erhebliche Bedeutung im Wirt-Parasit-Verhältnis zu haben. Im einzelnen ist aber auch dieser Zusammenhang noch zu wenig geklärt, um eine nähere Diskussion dieses Wirkungsweges zu rechtfertigen.

In Anlehnung an pharmakologische Erfahrungen wäre aber auch an mittelbare Wirkungen über die gebildeten (Thio-) Semicarbazone zu denken:

Aromatische Verbindungen des Typs

$$R — CH = N — NH — CO(S) \cdot NH_2$$

wurden unter anderem als Tuberkulostatica (vgl. MIETZSCH 1951) (und auch in der Rheumabehandlung) verwendet. HEITEFUSS wies bereits auf die Möglichkeit hin, daß analoge aliphatische Verbindungen durch Decarboxylierung der Ketosäure- (Thio-) Semicarbazone entstehen und eine spezifische Wirkung entfalten könnten. Eine Nachprüfung dieser Hypothese bedarf stabiler Verbindungen unter Einschluß entsprechender Aldehydabkömmlinge. Auf Grund einiger Vorversuche sind einfache aliphatische Ketosäure-TSC-one für diesen Zweck nicht brauchbar, sie werden in der Pflanze aufgespalten (ihre Anhäufung nach TSC-Behandlung ist offensichtlich an einen Überschuß von freiem TSC gebunden). Die starke Affinität des TSC zu Pyridoxalphosphat läßt auch an die Bildung kleinster Mengen wirksamer aromatischer TSC-one denken. Tastversuche mit TSC-onen von Pyridinaldehyden zeigten, daß diese eine weit höhere phytotoxische Wirkung entfalten als Ketosäure-TSC-one. Die wenigen in der Literatur bekannt gewordenen Beispiele für die Anwendung von SC-onen bzw. TSC-onen in der Chemotherapie von Pflanzenkrankheiten geben vorerst keinen weiteren Aufschluß (HAMILTON und SZKOLNIK 1958, SHIMOMURA et. al. 1958).

Auf die pharmazeutisch interessante Gruppe der Oxy- bzw. Mercapto-1, 2, 4-Triazinderivate, welche durch Ringschluß aus Ketosäure-TSC-onen entstehen könnte, sei nur am Rande hingewiesen (HAGENBACH et al. 1954).

Es wäre müßig, weitere Hypothesen zu erörtern, solange nicht nähere Anhaltspunkte für die Bedeutung des einen oder anderen skizzierten Weges der Wirkung von SC und TSC auf den pflanzlichen Stoffwechsel vorliegen. Ob unmittelbare Beziehungen zwischen den pharmakologischen Befunden und unseren Ergebnissen bestehen oder nicht: Der weitere Einblick in die von SC und TSC in der Pflanze ausgelösten Reaktionsfolgen scheint auch für die Beurteilung anderer Carbazidwirkungen nicht bedeutungslos zu sein.

Zusammenfassung

1. Durch Befall von Weißkohl mit *Peronospora parasitica* wird der Gehalt der Pflanzen an Ketoglutarsäure, Oxalessigsäure, Glyoxylsäure, Brenztraubensäure und Hydroxybrenztraubensäure nicht verändert, jedoch treten zwei Ketosäuren neu auf, deren eine vorläufig charakterisiert wird.

2. Die Veränderung des Ketosäuregehaltes von Weißkohlkeimpflanzen durch „Zufütterung" verschiedener Säuren und Zucker wird untersucht.

3. In *Peronospora*-befallenem Kohl ist die Aktivität der „Ascorbinsäureoxydase" um etwa 69 % vermindert, die der Glyoxylsäurereduktase und „Glycolsäureoxydase" nicht verändert.

4. Befallsmindernde Dosen von Äthylurethan verändern den Ketosäurespiegel nicht, solche von Fluorazetat vermindern den Gehalt an Ketosäuren des Zitronensäurezyklus, erhöhen aber den Glyoxylsäurespiegel.

5. Semicarbazid und Thiosemicarbazid erhöhen den Gehalt an Ketosäuren, insbesondere Glyoxylsäure, sehr stark durch Anreicherung von (Thio-) Semicarbazonen. Sie hemmen die Alanin-Ketoglutarsäure-Transaminase durch Abbindung von Pyridoxalphosphat sehr stark.

6. „Ascorbinsäureoxydase" wird nur durch Thiosemicarbazid gehemmt, wobei dem Schwefelatom entscheidende Bedeutung zukommt.

7. Semicarbazid und Thiosemicarbazid hemmen „Glycolsäureoxydase" durch Wirkung der 5-Aminogruppe.

8. Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit anderen Arbeiten diskutiert.

Summary

Further investigations on the pathological physiology of *Peronospora parasitica* on *Brassica oleracea*

1. The level of ketoglutaric acid, oxalacetic acid, glyoxylic acid, pyruvic acid and hydroxypyruvic acid is not altered in plants of white cabbage by attack with *Peronospora parasitica*, but two new ketoacids appear, a preliminary description of one of which is given.

2. The alteration in the ketoacid concentration in seedlings of green cabbage after administration of various acids and sugars was investigated.

3. In cabbage infected with *Peronospora* there was a reduction of about 69 % in "ascorbic acid oxidase" activity whereas the glyoxylic acid reductase and the "glycolic acid oxidase" were not changed.

4. Doses of ethyl urethane that reduce the infection do not alter the ketoacid level, those of fluoracetate reduce the content of ketoacids of the citric acid cycle but increase that of glyoxylic acid.

5. Semicarbazide and thiosemicarbazide increase the content of ketoacids, particularly that of glyoxylic acid, very distinctly by the accumulation of (thio-) semicarbazones. They inhibit the alanin-ketoglutaricacid-transaminase very conspicuously by combining with the pyridoxal phosphate.

6. "Ascorbic acid oxidase" is inhibited only by thiosemicarbazide, the sulphur atom being of particular importance in this reaction.

7. Semicarbazide and thiosemicarbazide inhibit "glycolic acid oxidase" by the action of the 5-amino group.

8. The results are discussed in connexion with other investigations.

Literaturverzeichnis

ALFTHAN, M., and A. I. VIRTANEN, 1955: Estimation of ketoacids in plants. Acta Chem. Scand. **9**, 186.

ALLEN, P. J., 1959 a: Metabolic consideration of obligate parasitism. In: Plant Pathology, Problems and Progress 1908—1958, The University of Wisconsin Press, 1 Madison.

— —, 1959 b: Physiology and biochemistry of defence. In: Plant Pathology, ed. HORSFALL and DIMOND, Academic Press, New York and London.

ÅBERG, B., 1958: Ascorbic acid. In: Handb. d. Pflanzenphysiologie, Bd. VI, Berlin.

CHERONIS, N. D., 1954: Micro- and semimicro Methods. In: Techniques of organic Chemistry, Vol. VI, New York.

CLAGETT, C. O., N. E. TOLBERT and R. H. BURRIS, 1949: Oxidation of a-hydroxy-acids by enzymes from plants. J. biol. Chem. **178**, 977.

COHEN, P. P., 1955: Transamination in animal tissue. In: Methods in Enzymology, Vol. II, New York.

CRUICKSHANK, D. H., and F. H. ISHERWOOD, 1958: Glutamic-alanine and glutamic-aspartic transaminases of wheat germ. Bioch. J. **69**, 189.

DALY, J. M., and R. E. INMAN, 1958: Changes in auxin levels in safflower hypocotyls infected with *Puccinia carthami*. Phytopathology **48**, 91.

DAVISON, A. N., 1956: The mechanism of the inhibition of decarboxylases by Isonicotinylhydrazide. Bioch. Bioph. Acta **19**, 131.

DAWSON, C. R., and R. J. MAGEE, 1955: Ascorbic acid oxydase. In: Methods in Enzymology, Vol. II, New York.

FUCHS, W. H., 1956: Ein Beitrag zur pathologischen Physiologie. Angew. Bot. **30**, 141.

Greenberg, J. B., and A. W. Galston, 1959: Tryptophane synthetase in pea seedling extracts. Plant Physiol. **34**, 5.

Hagenbach, R. R., E. Hodel und H. Gysin, 1954: Neue Derivate des 1,2,4-Triazins als Tuberculostatica. Angew. Chemie **66**, 359.

Hamilton, J. M., and M. Szkolnik, 1958: Control of *Coccomyzes hiemalis* by systemic movement of cycloheximide-semicarbazone in sour cherry following root of leaf absorption. Phytopathology **48**, 262.

Heitefuss, R., 1957: Untersuchungen zur pathologischen Physiologie von *Peronospora parasitica* auf *Brassica oleracea*. Diss. Göttingen.

— —, und W. H. Fuchs, 1960: Untersuchungen zur pathologischen Physiologie von *Peronospora brassicae* (Gäum.) auf *Brassica oleracea*. Phytopath. Z. **37**, 348.

Hicks, R. M., 1959: The effect of Isoniacid, Propamidine, Pentamidine and Carbutamide on the growth and transaminases of *Escherichia coli*. Bioch. J. **72**, 22 p.

— —, and J. Cymerman-Craig, 1957: Inhibition of the alanine-a-ketoglutaric acid transaminase of pig-heart muscle by cyclic hydrazides. Bioch. J. **67**, 353.

Kawerau, E., und W. R. Fearon, 1944: Hemmung der schwermetallkatalytischen Oxydation der Ascorbinsäure. Zeitschr. Vitaminforschung **14**, 356.

Kiraly, Z., and G. L. Farkas, 1957 a: On the role of ascorbic acid oxydase in the parasitically increased respiration of wheat. Arch. Bioch. Bioph. **66**, 474.

— —, and — —, 1957 b: Decrease in glycolic acid oxidase activity of wheat infected with *Pucc. graminis* var. *tritici*. Phytopathology **47**, 277.

Kornberg, H. L., and H. Beevers, 1957: The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans. Bioch. Bioph. Acta **26**, 531.

Krupka, R. M., and G. H. N. Towers, 1958: Studies of the ketoacids of wheat. I. Behavior during growth. II. Glyoxylic acid and its relation to allantoin. Canad. J. Bot. **36**, 165 u. 179.

— —, and — —, 1959: Studies of the metabolic relation of allantoin in wheat. Canad. J. Bot. **37**, 539.

Mayer, A. M., 1957: Inhibition of ascorbic acid oxidase by thiourea. Nature **180**, 1417.

Meister, A., and D. L. Abendschein, 1956: Chromatography of a-ketoacid-2,4-dinitrophenylhydrazones and their hydrogenation products. Anal. Chem. **28**, 171.

Mietzsch, F., 1951: Die Chemotherapie der Tuberkulose. Angew. Chemie **63**, 250.

Nielsen, J., 1960: Qualitativer Nachweis von Ketosäure-thiosemicarbazonen in Pflanzenextrakten. In Vorbereitung.

Paech, K., and M. V. Tracey, 1955: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. II. Berlin.

Ranson, S. L., 1955: Non volatile Mono-, Di- and Tricarboxylic acids. In Paech-Tracey (siehe oben).

Rohringer, R., 1957: Untersuchungen zur Biochemie von Weizenkeimpflanzen nach Infektion mit *Pucc. graminis tritici* R. 126 a. Phytopath. Z. **29**, 45.

— —, 1959: Allgemeine Pflanzenpathologie. Fortschr. Bot. **21**, 361.

Shaw, M., and A. R. Hawkins, 1958: The physiology of host-parasite relations. I. A preliminary examination of the level of free endogenous indoleacetic acid in rusted and mildewed cereal leaves and their ability to decarboxilate exogenously supplied radioactive indoleacetic acid. Canad. J. Bot. **36**, 1.

Shimomura, T., Y. Nishikawa and T. Imaizumi, 1959: Studies for the chemotherapy of plant virus diseases. III. Effect of thiosemicarbazones on the multiplication of tobacco mosaic virus. Ref. in: Rev. appl. Mycology **38**: 163.

Siebert, R., 1959: Biochemische Untersuchungen zum Wirt-Parasit-Verhältnis am Beispiel von *Pucc. graminis tritici*. Diss. Göttingen.

Sijpesteijn, A. K., and G. J. M. van der Kerk, 1956: Investigations on organic fungicides. X. Pyruvic acid accumulation and its relation to the phenomenon of inversion growth as affected by Na-Dimethyldithiocarbamate. Bioch. Bioph. Acta **19**, 280.

Uritani, I., and T. Akazawa, 1959: Alteration of the respiration pattern in infected plants. In: Plant Pathology, Academic Press, New York and London.

Virtanen, A. I., and M. Alfthan, 1954: New ketoacids in green plants. Acta Chem. Scand. **8**, 1720.

Youatt, J., 1958: The action of Isoniacid on the transaminases of *Mycobacterium tuberculosis* (B. C. G.). Bioch. J. **68**, 193.

Zelitch, I., 1955: Glycolic acid oxidase and glycolic acid reductase. In: Methods in Enzymology, Vol. I, New York.

— —, and S. Ochoa, 1953: Oxydation and reduction of glycolic and glyoxylic acids in plants. J. biol. Chem. **201**, 707.

Aus dem Institut für spezielle Botanik
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich
Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

Entomosporium maculatum Lév. als Erreger einer Fruchtfleckenkrankheit von *Cydonia oblonga* Mill.

Von

R. H. Rimpau

Mit 2 Abbildungen

Der von Léveillé (1861) erstmals gefundene Konidienpilz *Entomosporium maculatum* parasitiert auf *Cydonia oblonga* Mill. sowie *Pirus communis* L. und verursacht sich konzentrisch ausbreitende, braune Blattflecke. Innerhalb dieser Nekrosen bilden die subkutikulären Konidienlager flache Höcker von 200 bis 500 μ Breite und 40 bis 50 μ Höhe. Die Konidien weisen eine charakteristische Form auf: Sie bestehen aus vier annähernd ovalen Zellen, von denen die zwei größeren in der Längsachse übereinander stehen — eine von diesen besitzt einen größeren Durchmesser — während das kleinere Zellpaar nahezu gleich groß ist. Die beiden kleineren Zellen sind in den seitlichen Einschnürungen des Verbindungsstückes der größeren eingelagert. Drei der verbundenen Zellen besitzen fadenförmige Fortsätze.

Die Ausbreitung der Pilzhyphen im Wirtsgewebe und Anhäufung zahlreicher Nekrosen bedingen oft einen vorzeitigen Blattfall. Der Pilz überwintert saprophytisch im Blattgewebe und an dürren Trieben der Wirte; es entstehen sowohl Winterkonidienlager als auch Apothecien von *Diplocarpon Soraueri* (Kleb.) Nannf. der Gattung *Diplocarpon* Wolf, deren Ascosporen — bzw. keimfähige Konidien der Winterlager — im zeitigen Frühjahr wiederum junge Blätter der Quitte und Birne infizieren können.

Bisher wurden *Entomosporium maculatum* Lév. und seine Hauptfruchtform von der Mehrzahl der Autoren ausschließlich als Erreger einer Blattfleckenkrankheit beschrieben (Cooke and Ellis 1876, Sorauer 1878, Saccardo 1884, Oudemans 1901, Klebahn 1914, 1918, v. Höhnel 1921, Noack 1928, Nannfeldt 1932, Săvulescu und Sandu-Ville 1936 sowie Jorstad 1945). Lediglich Osterwalder (1928) berichtete aus der Schweiz über einen schwachen Befall der Quittenfrüchte im reifenden Stadium, während Köck (1920) ein seltenes Auftreten der Krankheit auf Früchten von *Pirus communis*

in Österreich feststellte. Von Quittenfrüchten hat bisher nur ATKINSON (1909) *Entomosporium maculatum* isoliert, ohne jedoch aus den Reinkulturen die Hauptfruchtform zu erhalten, während aus Apothecien von *Diplocarpon Soraueri* — von überwinterten Blättern aus Ithaka im Staate New York — die Nebenfruchtform entstand (ATKINSON 1897). Über die Befallsstärke der Früchte machte der Autor keine Angaben.

Im diesjährigen Herbst wurde in Zufikon, Kanton Aargau, erstmals ein starkes Auftreten von *Entomosporium maculatum* Lév. f. sp. *maculatum* Kleb. als Erreger einer Fruchtfleckenkrankheit von *Cydonia oblonga* Mill. beobachtet. Der Befall führte innerhalb einer Baumgruppe zum Totalausfall der Quittenernte. Der Konidienpilz infizierte sowohl die Früchte von *Cydonia oblonga* var. *piriformis* Medikus, als auch diejenigen von var. *maliformis* Mill. Auf der birnenförmigen Quitte konnte im Vergleich zur apfelförmigen ein stärkerer Befall festgestellt werden.

Abb. 1 (links). *Entomosporium maculatum* Lév. f. sp. *maculatum* Kleb. auf *Cydonia oblonga* Mill. var. *piriformis* Medikus. 3/5 nat. Gr., Orig. Phot. Inst. ETH

Abb. 2 (rechts). Konidienlager von *Entomosporium maculatum* Lév. f. sp. *maculatum* Kleb. auf *Cydonia oblonga* Mill., 8× vergrößerte Teilansicht einer Frucht. Orig. Phot. Inst. ETH

Die Primärsymptome auf den Früchten sind als punktförmige, schwarze bis dunkelbraune Nekrosen zu erkennen. Nachdem eine Spore die Kutikula durchdrungen hat, kommt es an der Infektionsstelle im weiteren Krankheitsverlauf zur Auflösung der das Fruchtfleisch einschließenden Haut und konzentrischen Ausbreitung der Flecke (Abb. 2). Bei *Entomosporium maculatum* Lév. f. sp. *maculatum* Kleb. scheint es sich in diesem Fall vermutlich um eine spezialisierte Rasse zu handeln, die imstande ist, die Fruchtfleckenkrankheit der Quitte zu verursachen. Innerhalb der Flecke entsteht ein farbloses Myzel mit üppiger Chlamydosporenbildung. Durch das Hinzukommen von Folgeparasiten wie *Fusarium* sp. und *Alternaria* sp. wird die Fruchtfäule der

Quitten sehr begünstigt. Ferner konnte aus den Befallsstellen *Trichothecium roseum* Fr. isoliert werden.

Da für *Entomosporium maculatum* verschiedene Wirte angegeben werden, und infolge des diesjährig starken Auftretens der Quittenfruchtkrankheit auch ein Übergreifen auf andere Wirtsarten als nicht ausgeschlossen erscheint, kommt der Frage der Wirtsspezifität eine besondere Bedeutung zu. Im Folgenden können nur Ergebnisse von Blattinfektionsversuchen mitgeteilt werden; denn bisher liegen keine Angaben über künstliche Infektionen der Früchte mit dem genannten Konidienpilz oder auch dessen Hauptfruchtform vor:

Nach Untersuchungen von Klebahn (1918) kann der Pilz auch auf *Pirus malus* L. parasitieren; jedoch müssen Apfelbäume als Nebenwirte von *Entomosporium maculatum* betrachtet werden, da diese Infektionen nur sehr selten stattfinden. Obwohl im Blattgewebe reife Konidien ausgebildet werden, vermag der Pilz nur bei epidemischem Auftreten auf einigen Blättern von *Pirus malus* vereinzelte Flecke zu verursachen. Eine weitere Ausbreitung findet jedoch nicht statt. Während der Infektionserfolg mit Konidien sowie Ascosporen, von *Pirus communis* isoliert, auf *Cydonia oblonga* nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, infizierte der Pilz von *Cydonia* außer der eigenen Wirtsart auch *Pirus communis* recht stark. Auf *Mespilus germanica* L. kam es nur vereinzelt zu Subinfektionen nach der Definition von Gäumann (1951). In noch geringerem Maße infiziert der Pilz *Amelanchier vulgaris* Moench, *Cotoneaster tomentosa* (Ait.) Lindl. und *Cotoneaster integerrima* Medikus. *Crataegus oxyacantha* L. und *Crataegus Crus galli* L. — letztere ist eine im atlantischen Nordamerika beheimatete Art, die in Europa als Zierstrauch eingeführt wurde und auch verwildert ist — erwiesen sich in den Infektionsversuchen von Klebahn (1918) als befallsfrei.

Über die Morphologie und systematische Stellung von *Entomosporium maculatum* Lév. wird in einer folgenden Arbeit berichtet.

Zusammenfassung

Der als Erreger der Blattfleckenkrankheit beschriebene Pilz *Entomosporium maculatum* Lév. f. sp. *maculatum* Kleb. konnte als Erreger einer erstmals stark aufgetretenen Fleckenkrankheit der Früchte von *Cydonia oblonga* Mill. identifiziert werden. Es wurde sowohl das Schadbild beschrieben als auch die Wirtsspezifität dieses Parasiten kurz behandelt.

Summary

The parasite of the leaf-spot disease, known as *Entomosporium maculatum* Lév. f. sp. *maculatum* Kleb., has been found for the first time to cause severe fruit-spot of *Cydonia oblonga* Mill. The symptoms of the disease are described and the host specificity of this parasite is briefly discussed.

Literaturverzeichnis

Atkinson, G. F., 1897: Leaf-spot of pear. Garden and Forest 10, 73—74.

— —, 1909: The perfect stage of leaf spot of pear and quince. Science 30, 452.

Cooke, M. C., and J. B. Ellis, 1876: Grevillea 4, Tab. 99.

Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl., Verl. Birkhäuser, Basel, 681 S.

Höhnel, F. v., 1921: Bemerkungen zu H. Klebahn, Haupt- und Nebenfruchtformen der Ascomyceten, 1918. Hedwigia 62, 38—55.

Jorstad, I., 1945: Parasitsoppene på kultur- og nyttevekster i Norge. I. Sekksporesopper (*Ascomycetes*) og konidiesopper (*Fungi imperfecti*). Medd. plantepat. Inst., Oslo, 1, 142 S.

Klebahn, H., 1914: Aufgaben und Ergebnisse biologischer Pilzforschung. Vortr. Gesamtgeb. Bot., hrsg. v. d. Dtsch. Bot. Ges. H. 1, 1—41.

— —, 1918: Haupt- und Nebenfruchtformen der Askomyceten. Verl. Borntraeger, Leipzig, 395 S.

Köck, G., 1920: Der Erreger der Birnblattbräune auf Früchten. Z. Garten- u. Obstbau 2. F., 1, 42.

Léveillé, J. H., 1861: In Mougeot: Stirpes cryptogamae Vogesorhenanae quas in Rheni superioris inferiorisque, nec non Vogesorum praefecturis collegerunt. Bruyerii Voges. 15, Nr. 1458.

Nannfeldt, J. A., 1932: Studien über die Morphologie und Systematik der nicht-lichenisierten inoperculaten Discomyceten. Nov. Act. Reg. Soc. Sci. Upsal., ser. 4, 8, 368 S.

Noack, M., 1928: *Sphaeriaceales*. In Sorauer: Die pflanzlichen Parasiten. Handb. Pflanzenkrankh. II, 1, 5. Aufl., Verl. Paul Parey, Berlin, 589—680.

Osterwalder, A., 1928: Die Blattflecken- oder Blattfallkrankheit der Quitten. Mitt. Schweiz. Versuchsanst. Obst-, Wein- u. Gartenbau, Wädenswil, Flugschr. 7, 201—204.

Oudemans, C. A. J. A., 1901: Contributions à la flore mycologique des Pays-Bas XVII. Nederl. Kruidkund. Arch. 3, ser. 2, 170—351.

Saccardo, P. A., 1884: *Sphaeropsideae* et *Melanconieae*. Sylloge fungorum 3, 860 S.

Săvulescu, T., und C. Sandu-Ville, 1936: Beitrag zur Kenntnis der Micrgmyceten Rumäniens. Hedwigia 75, 159—233.

Sorauer, P. C. M., 1878: Die Fleckenkrankheit oder Blattbräune der Birnen. Mschr. d. Ver. z. Beförd. d. Gartenb. i. d. kgl. preuß. Staaten 21, 32—41.

Aus dem Phytopathologischen Institut
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. M. Klinkowski

Zur Löslichkeit des Kohlrübenmosaikvirus bei verschiedener H-Ionenkonzentration[1])

Von

Christiane Schade

Bei der Reinigung pflanzenpathogener Viren will man im allgemeinen, nach weitgehender Entfernung alles nicht infektiösen Materials, eine möglichst hohe Konzentration infektiöser Virusteilchen erreichen. Die Konzentration wird vom pH-Wert des Lösungsmittels beeinflußt, das zur Aufnahme des sedimentierten Virus dient. Einige Viren, z. B. das Streifenmosaikvirus der Gerste, neigen dazu, während des Reinigungsprozesses nach der Ammoniumsulfatfällung in Wasser unlöslich zu werden, während sie in Boratpuffer (pH 7,5) löslich sind (Kassanis und Slykhuis 1959). Vermutlich hat das Kohlrübenmosaikvirus (KMV) ähnliche Eigenschaften. Larson, Matthews und Walker (1950) stellten nämlich fest, daß die Viruskonzentration des KMV nach der Reinigung in keinem Fall höher war als im rohen Preßsaft, obgleich das Virus vollständig sedimentiert worden war. Sie verwendeten destilliertes Wasser als Lösungsmittel. Dagegen nahm Martini (1957) das KMV nach Ultrazentrifugierung mit Kolthoff-Puffer oder 0,05 M Boraxlösung auf, machte aber keine Angaben über die Viruskonzentration dieser Suspensionen. Für die Gewinnung weitgehend gereinigter, konzentrierter Antigene zur Immunisierung von Kaninchen war es von Interesse, zu untersuchen, bei welcher Wasserstoffionenkonzentration das sedimentierte KMV am besten löslich ist. Die Viruskonzentration der verschiedenen Suspensionen mit pH-Werten von 8,0 bis 9,4 wurde serologisch und im Infektionstest auf *Nicotiana tabacum* geprüft. Nach vierwöchiger Aufbewahrung der Virussuspensionen bei + 2 °C erfolgte die Wiederholung der beiden Tests, um die Beständigkeit der gereinigten KMV-Suspensionen bei verschiedener H-Ionenkonzentration festzustellen.

[1]) Herrn Prof. von Guttenberg zum 80. Geburtstag gewidmet.

Methodik

Zur Untersuchung diente das von ULLRICH (1955) beschriebene KMV und eine von Rhabarber isolierte Herkunft (SCHADE 1959). Die beiden Isolate sind serologisch als Stämme des KMV zu differenzieren. Die Viren wurden auf *Nicotiana glutinosa* L. kultiviert. Die Viruskonzentration in der Pflanze ist nach LARSON, MATTHEWS und WALKER gering. Als optimale Temperatur für die Vermehrung des KMV geben POUND und WALKER (1945) 28 °C an. Die Gewächshaustemperatur schwankte zwischen 22 und 30 °C. Die Versuche wurden im Juli 1959 begonnen und im Sommer 1960 wiederholt. Die Ernte der Pflanzen, deren serologisch gemessene Viruskonzentration bei $^1/_8$ bis $^1/_{16}$ lag, erfolgte 3 bis 4 Wochen p. i. Um eine geeignete Methode zur ausreichenden Reinigung des Virus zu finden, wurde es verschiedenen chemischen und physikalischen Behandlungen unterworfen. Dabei zeigte sich, daß das KMV im Preßsaft — tiefgefroren — nicht lange haltbar ist; bei — 10 °C hat es bereits nach 8 Tagen einen Teil seiner Infektiosität verloren. Behandlung des Preßsaftes mit Chloroform zur Entfernung des Chlorophylls verringert die Infektiosität des Virus stark. Nach Fällung mit $^1/_3$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung, 50%igem Aceton oder 50%igem Äthylalkohol geht ebenfalls ein Teil seiner Infektiosität verloren. Das KMV ist demnach gegen die chemische Behandlung, die häufig vor der hochtourigen Zentrifugierung angewandt wird, zu empfindlich. Die partielle Reinigung erfolgte in folgender Weise:

1 Vol roher Preßsaft
↓
10 min zentrifugieren bei 500 g
↓
Überstand 10 min 48 °C
↓
30 min zentrifugieren bei 3700 g
↓
Überstand 60 min zentrifugieren bei 60 000 g
↓
Sediment in $^1/_{10}$ Vol 0,05 M H_3BO_3 (pH 8,0 bis 9,4) aufnehmen
60 min + 2 °C
↓
20 min zentrifugieren bei 2500 g

Die angegebene Erwärmung des Preßsaftes auf 48 °C für 10 min hat keinen Titerverlust zur Folge. Das Virussediment wurde mit 0,05 M Borsäure (pH 8 bis pH 9,4) nach CLARK und LUBS (H_3BO_3 + NaOH) aufgenommen. Phosphatpuffer wurde nicht verwendet, weil die Infektiosität des KMV nach LARSON, MATTHEWS und WALKER durch Natriumphosphat beeinträchtigt wird. Die pH-Werte der Pufferlösungen differierten um 0,2. Jede Lösung wurde zur Aufnahme des Sediments von 140 ml Preßsaft verwendet. Die Kontrolle der pH-Werte erfolgte mit dem pH-Meßgerät Typ MV 11 von CLAMANN und GRAHNERT, Dresden. Die Infektiosität der Virussuspensionen wurde durch Abreibung mit Carborund auf je 40 Blätter von *Nicotiana tabacum* L. var. „White Burley" geprüft und mit derjenigen des

Ausgangsmaterials verglichen. *Nicotiana tabacum* reagiert auf das KMV nach 5 bis 6 Tagen mit deutlichen braunen Lokalläsionen, deren Zentrum hellgefärbt ist. Die stark alkalischen Lösungen riefen keine Schäden auf den abgeriebenen Blättern hervor, so daß Infektiosität und serologische Aktivität der Virussuspensionen verglichen werden konnten.

Ergebnisse

Bei den Versuchen ergaben sich innerhalb des geprüften pH-Bereichs deutliche Unterschiede in der Löslichkeit des KMV. Die verwendeten Stämme verhielten sich gleichsinnig, so daß die Wiedergabe nur eines Protokolls genügt (s. Tab.).

Tabelle

Serologische Aktivität und Infektiosität des partiell gereinigten Kohlrübenmosaikvirus bei verschiedenen pH-Werten des Lösungsmittels

pH-Werte des Boratpuffers	Serologischer Titer des KMV		Infektiosität des KMV mittlere Läsionenzahl je Blatt	
	sofort nach der Reinigung	nach 4 Wochen + 2 °C	sofort nach der Reinigung	nach 4 Wochen + 2 °C
8,0	1/8	0	9	3
8,2	1/8	0	14	8
8,4	1/16	1/4	9	15
8,6	1/32	1/4	30	14
8,8	1/64	1/16	114	106
9,0	1/64	1/32	112	118
9,2	1/64	1/32	120	123
9,4	1/32	1/16	125	111

Bei jeder Versuchsreihe wurde die Viruskonzentration des Preßsaftes, der als Ausgangsmaterial diente, gemessen. Für den in der Tabelle angegebenen Fall betrug der Virustiter des Preßsaftes 1/8, die Infektiosität, gemessen an der Läsionenzahl je Blatt, 53. Aus der Tabelle geht hervor, daß bei Suspensionen im pH-Bereich 8,8 bis 9,2 nach der Reinigung gesteigerte serologische Aktivität und Infektiosität vorhanden sind. In diesem pH-Bereich ist das KMV am besten löslich. Einen Beweis dafür, daß die schwächere serologische Aktivität und Infektiosität der Suspensionen bei den pH-Werten 8,0 bis 8,4 auf der geringeren Löslichkeit des Virus beruht, ergab folgender Versuch: Nach Aufnahme des Virus wurden die unlöslichen Bestandteile kurz abzentrifugiert. Wurde dieses Material erneut mit Boratpuffer aufgenommen, dessen pH-Wert im optimalen Bereich 8,8 bis 9,2 lag, so löste sich wieder ein großer Teil des Virus, wie der serologische Titer und der Infektionstest zeigten. Das Unlöslichwerden des KMV in diesem pH-Bereich ist also reversibel.

Aus der Tabelle ist ferner zu ersehen, daß serologische Aktivität und Infektiosität sich nicht immer entsprechen. Suspensionen vom pH-Wert 8,6

und 9,4 haben serologisch denselben Virustiter, während die Infektiosität bei pH 9,4 bedeutend größer ist. Der Preßsaft besitzt vor der Reinigung einen Virustiter von $^1/_8$ und ruft 53 Läsionen je Blatt hervor. Den gleichen Virustiter haben Suspensionen vom pH-Wert 8,0 und 8,2 nach der Reinigung, ihre Infektiosität ist aber geringer als die des rohen Preßsaftes. Betrachten wir die Stabilität der Virussuspensionen nach vierwöchiger Aufbewahrung bei + 2 °C, so zeigt sich in bezug auf die serologische Aktivität im optimalen pH-Bereich eine Abnahme des Titers um 1 bis 2 Verdünnungsstufen, bei pH-Werten von 8,0 bis 8,6 sind es 2 bis 3 Stufen. Die Infektiosität dagegen ist im gesamten geprüften pH-Bereich praktisch unverändert geblieben.

Zusammenfassung

Die Löslichkeit des Kohlrübenmosaikvirus ist in Boratpuffer im pH-Bereich 8,8 bis 9,2 am größten, gemessen an der serologischen Aktivität und Infektiosität des Virus. Bei höherer H-Ionenkonzentration wird das Virus zum Teil unlöslich, der Vorgang ist im geprüften pH-Bereich 8,0 bis 8,4 reversibel.

Summary

The solubility of turnip mosaic virus is greatest in a borate buffer in the pH range of 8.8 to 9.2, when measured by the serological activity and infectivity of the virus. At higher H ion concentrations the virus becomes partially insoluble, the phenomen being reversible in the pH range 8.0 to 8.4.

Literaturverzeichnis

Kassanis, B., and J. T. Slykhuis, 1959: Some properties of Barley stripe mosaic virus. Ann. appl. biol. 47, 254—263.

Larson, R. H., R. E. F. Matthews and J. C. Walker, 1950: Relationships between certain viruses affecting the genus *Brassica*. Phytopathology 40, 955—962.

Martini, Ch., 1957: Versuche zur Reinigung und Herstellung der Antiseren von Blumenkohlmosaik (cauliflower mosaic virus) und Schwarzringfleckigkeit des Kohles (cabbage black ring spot virus). Naturwissenschaften 44, 426—427.

Pound G. S., and J. C. Walker, 1945: Differentiation of certain crucifer viruses by the use of temperature and host immunity reactions. J. agr. res. 71, 255—278.

Schade, C., 1959: Zur Frage der serologischen Verwandtschaft zweier Virusisolate von Rhabarber mit dem Kohlrübenmosaikvirus. Phytopath. Z. 35, 433—436.

Ullrich, J., 1955: Die Schwarzringfleckigkeit des Kohls in Deutschland. Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 7, 164—165.

Aus dem Institut für Pflanzenschutz
der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim
Direktor: Prof. Dr. B. Rademacher

Untersuchungen über *Sphaceloma menthae* Jenkins, den Erreger der Pfefferminzanthraknose[1])

Von

Vasilija Dermelj

Mit 11 Abbildungen

Inhalt: A. Einleitung. — B. Das Krankheitsbild. — C. Untersuchungen über den Erreger der Pfefferminzanthraknose *Sphaceloma menthae* Jenk. I. Isolierung; II. Morphologie; 1. An der Pflanze, 2. In vitro; III. Einfluß von Umweltfaktoren; 1. Nährsubstrate, 2. Temperatur, 3. Wasserstoffionenkonzentration; IV. Biologie des Pilzes; 1. Konidienkeimung, 2. Inkubation, 3. Pathogenität, 4. Überwinterung, 5. Übertragung. — D. Bekämpfung. I. Mechanische Bekämpfung; II. Chemische Bekämpfung; 1. Plattentest, 2. Gewächshausversuche, 3. Freilandversuche, 4. Untersuchungen über Kupfer- und Eisenrückstände, 5. Pfefferminzölgehalt *Sphaceloma*-befallener Pflanzen in Abhängigkeit von chemischen Behandlungsmitteln. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

A. EINLEITUNG

Im allgemeinen weniger bekannt sind die durch Pilze der Gattung *Sphaceloma* hervorgerufenen Anthraknosen, obwohl sie an einem breiten Kreis von Pflanzenfamilien auftreten. So isolierte de Bary (1873) *Sphaceloma ampelinum* von Weinreben. Es gelang Jenkins (1925), *Sphaceloma* als eigentlichen Erreger des *Citrus*-Schorfs (skab) zu determinieren. Diese Erkrankung verschiedener *Citrus*-Arten wurde bis dahin *Cladosporium citri* zugeschrieben (Fawcett 1916). Von Jenkins (1925) wurde der Erreger jedoch als *Sphaceloma* erkannt und *S. fawcettii* genannt. In den folgenden Jahren ist *Sphaceloma* an Blättern, Stengeln und Früchten weiterer Kräuter, Sträucher und Bäume gefunden worden. Die bisherigen Arbeiten über die Gattung *Sphaceloma* und ihre Wirtspflanzen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

[1]) Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Bernhard Rademacher, möchte ich für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut, für das Interesse an meiner Arbeit und für alle Hinweise und Ratschläge aufrichtig danken.

Weiter gilt mein besonderer Dank der Alexander-von-Humboldt-Stiftung, welche mir die Durchführung der Arbeit finanziell ermöglichte und auch sonst Förderung zuteil werden ließ.

Tabelle 1

Sphaceloma-Arten und deren Wirtspflanzen

Nebenfruchtform *Sphaceloma*	Hauptfruchtform *Elsinoë*	Wirtspflanze	Literatur Nr.
S. abutilonis B. et J.	—	*Abutilon striatum*	19, 20
S. aegiphilae B. et J.	—	*Aegiphila sellowiana*	19
S. amazonensis B. et J.	—	*Bignoniaceae*	19
S. ampelinum (DBy) Shear	*E. ampelina*	*Vitis vinifera*	9, 28, 44, 71
S. arachidis B. et J.	—	*Arachis hypogaea*	15
S. araliae J.	—	*Aralia spinosa*	40, 48
S. australis B. et J.	*E. australis*	*Citrus sinensis*	44
S. batatas J. et V.	*E. batatas*	*Ipomoea batatas*	55, 48
*S.**)	*E. bertholletiae*	*Bertholletia excelsa*	12
S. bidentis B. et J.	—	*Bidens pilosa*	19
S. cassiae B. et J.	—	*Cassia splendida*	18
S. catalpae Kur. et Kat.	—	*Catalpa speciosa*	57
S. cercocarpi J.	—	*Cercocarpus albus*	50
*S.**)	*E. cinchonae*	*Cinchona pubescens*	48
		Cinchona dellessertiana	48
S. curcumae Thir.	—	*Curcuma* sp.	75
S. ditremexae B. et J.	—	*Ditremexa hirsuta*	19
		Cassia hirsuta	19
S. entandophragmae B. et J.	—	*Entandophragma angolense*	45
S. erythrinae B. et J.	—	*Erythrina crista galli*	19
S. fagarae B. et J.	—	*Fagara hiemalis*	19
		Fagara riedeliana	19
S. fawcettii J.	*E. fawcettii*	*Citrus nobilis*	13, 32, 34, 35, 44
S. fawcettii var. *scabiosa* J.	—	*Citrus medica*	39
S. fici Thir.	—	*Ficus glomerata*	74
S. genipae B.	—	*Genipa americana*	11
S. glycinis Kurata et K.	—	*Glycine*	56
S. guatemalensis B. et J.	—	*Centropogon cordifolius*	19
S. hederae B. et J.	—	*Hedera helix*	50
S. hoveniae B. et J.	—	*Hovenia dulcis*	19
S. heveae B. et J.	*E. heveae*	*Hevea rubber*	21
S. krugii Costa	—	*Euphorbia prunifolia*	27
S. lippiae Ba. et Cu.	—	*Lippia nodiflora*	64
S. magnoliae J.	*E. magnoliae*	*Magnolia grandiflora*	52, 62
S. mangiferae B. et J.	*E. mangiferae*	*Mangifera* sp.	17, 48
S. manichoticola B. et J.	—	*Manichot glaziovii*	20
S. mattirolianum Arnaud et B.	*E. mattirolianum*	*Arbutus unedo*	5, 59
S. meliae B. et Neto	—	*Melia azedarach*	22
S. menthae J.	—	*Mentha piperita* L.	40
		Mentha piperita var. *vulgaris* Sole	6
		M. arvensis var. *piperascens* Malinvaud	6
		M. spicata L.	6
S. murrayae J.	—	*Salix fragilis*	51
		Salix babilonica	51
S. necator J. (Shear)	*E. veneta*	*Rubus* sp.	44, 53
S. oleanderi Thir.	—	*Nerium oleander*	74
S. papayae Wallace (J.)	—	*Carica papaya*	79
S. persae J.	—	*Persea americana*	38
		Persea gratissima	38

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Nebenfruchtform *Sphaceloma*	Hauptfruchtform *Elsinoë*	Wirtspflanze	Literatur Nr.
S. phyllocalycis B. et J.	—	*Phyllocalyx laevigatus*	19
S. pirinum J.	*E. piri*	*Pomoideae*	42, 48
S. plantaginis J.	—	*Plantago* sp.	77
S. poinsettiae J.	—	*Euphorbia pulcherrima*	41, 47
S. populi J.		*Populus nigra*	37
S. pruni J.	—	*Prunus capuli*	43
		P. domestica	
S. psidii B. et J.	—	*Feijoa sellowiana*	18, 47
S. punicae B. et J.	—	*Punica granatum*	14
S. oleae Ciccarone	*E. oleae*	*Olea europaea*	25
*S.**)	*E. quercicola*	*Quercus nigra*	49
*S.**)	*E. randii*	*Hicoria pecan*	48
S. ribis J. et B.	—	*Ribes grossularia*	50
S. ricini Cheo et J.	—	*Ricinus communis*	24
S. rosarum (Pass.) J.	—	*Rosa* sp.	36, 48, 61
S. santali Thir.	—	*Santalum album*	74
S. sesseae B. et J.	—	*Sessea brasiliensis*	19
*S.**)	*E. sesbaniae*	*Sesbania exaltata*	58
S. solidaginis J. et U.	*E. solidaginis*	*Solidago* sp.	54
S. spondiadis B. et J.	—	*Spondias purpurea*	14
		Spondias dulcis	14
S. symphoricarpi Barrus et H.	—	*Symphoricarpus albus*	8, 48
S. terminaliae B.	—	*Terminalia catappa*	11
		Terminalia bellerica	11
S. theae J. et B.	*E. theae*	*Thea sinensis*	46, 48
S. tsugii J. et B.	—	*Paulownia tomentosa*	48
S. viburni J. et B.	—	*Viburnum opulus* var. *roseum*	50
		Viburnum suspensum	64
		Viburnum obovatum	64
S. violae Massey et J.	—	*Viola odorata*	60, 77
S. viticola B. et J.	*E. viticola*	*Vitis scifuniensis*	48

B. = Bitancourt, A. A.; Ba. = Baines, R. C.; Cu. = Cummins; H. = Horsfall; Kat. = Katsuki, S.; K. = Kuribayaski; Kur. = Kurosawa, E.; Thir. = Thirumalachar; U. = Ukkelberg, H. G.; V. = Viegas, A. P.

*) Bei diesen Arten ist zwar die *Sphaceloma*-Nebenfruchtform bekannt, jedoch die Art bisher nicht beschrieben worden.

Auch bei einigen in den USA angebauten *Mentha*-Arten (*M. piperita* L. var. *vulgaris* Sole, *M. arvensis* var. *piperascens* Malinvaud und *M. spicata* L.) ist eine Anthraknoseerkrankung schon länger bekannt. Im Jahre 1931 erweckte sie zum erstenmal die Aufmerksamkeit der Anbauer im Staate Indiana USA. Sie wurde „leopard spot" benannt, von Jenkins (1937) und Baines (1938) beschrieben und als *Sphaceloma menthae* Jenkins, *Fungi imperfecti, Melanconiales, Melanconiaceae,* determiniert.

Im Sommer 1956 trat nun auch in Jugoslawien im Moorgebiet Ljubljansko Barje in erstjährigen Beständen von *Mentha piperita* (Valenčič und Dermelj 1956) eine Anthraknose auf.

Die Pfefferminze, *Mentha piperita* L.[1]) Sorte Mitcham, ist eine der wichtigsten Arzneipflanzen, die zur Zeit in Jugoslawien angebaut werden. Somit stellt die Gefährdung ihres Anbaues durch die aufgetretene Anthraknose ein wesentliches Problem dar. Ihre Ausbreitung würde durch die Verminderung des Ertrages und Verschlechterung der Qualität der Droge zu beachtlichen Schäden führen.

B. DAS KRANKHEITSBILD

Als erste Symptome treten zehn bis zwölf Tage nach der Infektion an den jüngsten Blättern punktartige, von einer aufgehellten Zone umrandete Nekrosen auf. Die Blätter deformieren kräuselig. Die befallenen Stellen färben sich nach wenigen Tagen in der Mitte aschgrau und sind durch einen rötlichbraunen Rand vom gesunden Gewebe getrennt (Abb. 1). Die meist runden Flecke haben einen Durchmesser von 1 bis 3 mm. In den nekrotischen Blattflecken werden Kutikula und Epidermis meistens völlig zerstört. Mit der Zerstörung des Mesophylls schwindet der Zellinhalt und übrig bleibt das mit vielen Hyphen durchwucherte Gewebeskelett, an dessen Oberfläche sich Sporenlager bilden. Beim Blattbefall werden auch die Öldrüsen zerstört (Abb. 2), wodurch der Ölgehalt der befallenen Blätter beträchtlich sinkt.

Abb. 1. Flecke an jungen Pfefferminzblättern nach künstlicher Infektion mit *Sphaceloma menthae*

[1]) *Mentha piperita* L. ist ein Bastard zwischen *Mentha spicata* L. em Nathh. (syn. *M. viridis* L.) × *Mentha aquatica* L. Da *Mentha spicata* L. em Nathh. wiederum ein Bastard zwischen *Mentha longifolia* (L.) Huds. (syn. *Mentha silvestris* L.) × *Mentha rotundifolia* (L.) Huds. ist, wird *Mentha piperita* L. als dreifacher Bastard (= Tripelbastard) bezeichnet. Die Pfefferminze wird in Kulturen vegetativ und niemals durch Samen vermehrt.

Zwei bis drei Tage nach dem Auftreten der Blattsymptome werden auch an den Stengeln und Blattstielen gleiche Flecke sichtbar. Die unterirdischen Pflanzenteile bleiben befallsfrei. Die Form der Flecke ist elliptisch und erreicht eine Größe von 2 bis 5 × 2 bis 3 mm. Die befallenen Stellen sinken kraterartig ein, werden in der Mitte aschgrau und bleiben von einer rötlichbraunen Zone umrandet. Bei starkem Befall können mehrere Flecke zusammenfließen und größere Stengelpartien einnehmen (Abb. 3).

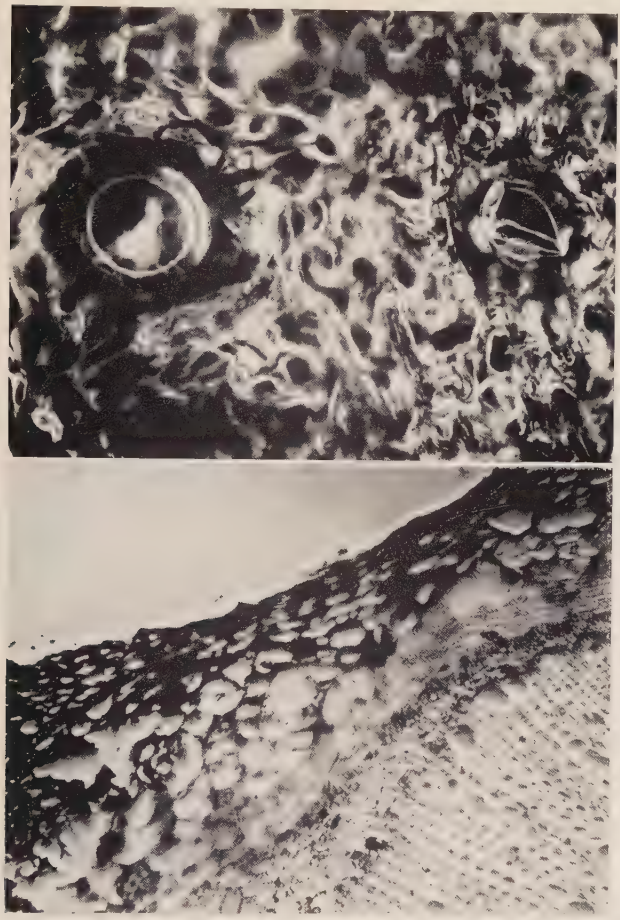

Abb. 2 (oben). Ausschnitt aus einem Pfefferminzblatt.
Links: normale Öldrüse; rechts: durch *Sphaceloma menthae* zerstörte Öldrüse
Abb. 3 (rechts). Pfefferminzanthraknose. Stengelausschnitt
Abb. 4 (unten). Querschnitt durch einen anthraknosekranken Pfefferminzstengel

An Stengelquerschnitten ließ sich beobachten, wie das zuerst Kutikula und Epidermis durchwuchernde Myzel später in das Rindenparenchym hineinwächst. Die Zellen kollabieren und die Interzellularen werden von Hyphen ausgefüllt. Die Pflanze reagiert auf den Befall durch Bildung eines Korkgewebes (Abb. 4), wodurch der Infektionsherd abgegrenzt wird.

Infizierte Pflanzen zeigen anomales Wachstum; sie entwickeln weniger Blätter und Seitensprosse. Stark befallene Blätter fallen vorzeitig ab, neu gebildete bleiben klein und chlorophyllarm, teilweise deformiert. Auffallend ist eine starke Verlängerung der Internodien (Abb. 5). In einem Freilandversuch wurden Internodienmessungen 30 Tage nach der künstlichen Infektion der Pfefferminze an kranken und gesunden Pflanzen durchgeführt. An jeweils 100 gesunden und kranken Sprossen wurde das siebente Internodium gemessen, gezählt von der Stengelbasis aus. Für gesunde Pflanzen betrug die durchschnittliche Länge 47,7 ± 7,2 mm und für kranke 70,9 ± 8,0 mm[1]). Es waren somit die Internodien befallener Pflanzen um 48,6 % länger. Besonders auffällig ist diese Verlängerung dann, wenn die Pfefferminze im fortgeschrittenen Vegetationsstadium infiziert wird. Die unteren Internodien sind normal, während die nach der Infektion gebildeten an Länge wesentlich zunehmen. Die neu gebildeten Seitensprosse sind durchweg anomal.

Abb. 5. Veränderungen am Habitus. Links: gesunde Pflanze; rechts: verlängerte Internodien einer befallenen Pflanze

Schon beim ersten Schnitt im Juli treten in erkrankten Beständen Ertragsverluste auf. Nach der Ernte treiben die befallenen Pflanzen schwach aus, und die zurückgebliebenen Stoppeln stellen eine Quelle für erneute Infektionen dar. Im zweiten Anbaujahr ist der Schaden wesentlich größer. Bereits infizierte Pflanzen überwintern schlecht, der lückige Bestand verunkrautet stark, so daß sich in diesem Zustand der Anbau nicht mehr lohnt.

Nach bisherigen Beobachtungen ist die epidemische Ausbreitung der Pfefferminzanthraknose von Temperatur und Feuchtigkeit abhängig. So sind für ihr Auftreten Temperaturen ab 15 °C und (1 bis 2 Tage) Feuchtigkeitssättigung der Atmosphäre notwendig, wie sie bei Regenfällen oder lang andauerndem Nebel vorliegen. Diese Bedingungen treten im Gebiet Ljubljansko Barje in für den Befall günstigen Jahren bereits im Mai, spätestens aber im Juni auf und dauern bis Ende August—Mitte September. Im Juni können starke Niederschläge oder andauernde Nebel bei ansteigenden Temperaturen die Infektion begünstigen. So trat im Juni 1956 starker *Sphaceloma*-Befall auf (durchschnittliche Monatstemperatur 15,9 °C, Niederschlagsmenge 203 mm). Auch im Jahre 1958 waren im Juni günstige Befallsvoraussetzungen gegeben (17,2 °C; 171 mm), dagegen waren sie im Jahre 1957 erst im Juli vorhanden. Auffallend ist, daß gerade im Jahre 1957 der

[1]) Vertrauensbereiche der Mittelwerte für 95 % Sicherheit (MUDRA 1958).

Anfang Juli vorgenommene erste Schnitt, auf den schon seit 1956 beobachteten Feldern relativ wenig von *Sphaceloma menthae* befallen war. Eine regelmäßige Beobachtung von Temperatur, Niederschlägen und Nebelhäufigkeit dürfte erlauben, Prognosen für die Infektionsstärke in anthraknosegefährdeten Gebieten (Moor) zu stellen.

C. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN ERREGER DER PFEFFERMINZANTHRAKNOSE

I. Isolierung

Sphaceloma menthae läßt sich nur von jungen Befallsstellen sicher isolieren. Bei Isolierungsversuchen von älteren nekrotischen Flecken gelangen zu viele Keime anderer Pilze und Bakterien in den Plattenguß und überwuchern das sehr langsam wachsende *Sphaceloma*-Myzel, ehe dieses mit bloßem Auge erkennbar wird. Deshalb sind nur solche Blätter und Stengel zu verwenden, deren Flecke noch mit einer aufgehellten Zone umrandet sind, also etwa 14 Tage alte Infektionen.

Methodik

Befallene Blatt- und Stengelstücke werden in Leitungswasser gespült und für 30 Sekunden in 0,1%ige Sublimatlösung gelegt. Nach anschließendem dreimaligem Abspülen in sterilem dest. Wasser werden die Pflanzenteile in kleine Teilstücke zerschnitten und mit einer sterilen Impfnadel auf Haferflocken- oder Wasseragarplatten übertragen. Trotz langsamen Wachstums des Myzels auf Wasseragar eignet sich dieser besser, weil die Gefahr der Fremdinfektionen geringer ist. Eine Isolierung der Konidien durch Abstreifen gelang nicht.

Die Isolierung erfolgte im Juni 1958 von befallenen Pflanzen der *Mentha piperita* L. Mitcham, Standort Ljubljansko Barje. Der isolierte Pilz wurde mit dem Pilz *Sphaceloma menthae* Jenkins Stamm 487, welcher vom Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland, bezogen wurde, verglichen und als *Sphaceloma menthae* Jenkins identifiziert. Wegen mancher morphologischer und ernährungsphysiologischer Eigenschaften, auf welche in Folgendem hingewiesen wird, wurde er als *Sphaceloma menthae* Jenkins Stamm Ljubljana (Stamm L) bezeichnet.

II. Morphologie

1. An der Pflanze

Die geschlechtliche Fruchtform des Erregers der Pfefferminzanthraknose ist noch nicht bekannt. Jenkins (1937) und Baines (1938) beschrieben die imperfekte Form des Pilzes. Jenkins beobachtete hemisphärische oder flache Acervuli mit kompakten hellgelben palisadenförmigen Konidienträgern, von welchen Konidien abgeschnürt werden. Dagegen fand Baines Konidien nur in dünnen, oberflächlichen, fertilen Stromata, jedoch keine erhabenen Sporenlager und auch keine Konidienträger. In eigenen Versuchen konnte bei trockener Witterung keine Konidienbildung festgestellt werden. Nach längerem Feuchthalten befallener Pflanzen im Freiland oder nach zweitägigem Aufbe-

wahren der befallenen Pflanzenteile in Petrischalen auf feuchtem Filtrierpapier bildeten sich an der Oberfläche der nekrotischen Stellen erhabene gelbe oder hellbraune, den von JENKINS beschriebenen Acervuli ähnliche Sporenlager mit 40 bis 120 μ im Durchmesser (Abb. 6). Bei mikroskopischer Untersuchung angefertigter Handschnitte löst ein leichter Druck auf das Deckgläschen die dem Fruchtkörper noch anhaftenden Konidien ab, so daß sie deutlich erkennbar werden. Sie sind elliptisch, hyalin und haben eine Größe von 4 bis 8 × 2 bis 4 μ.

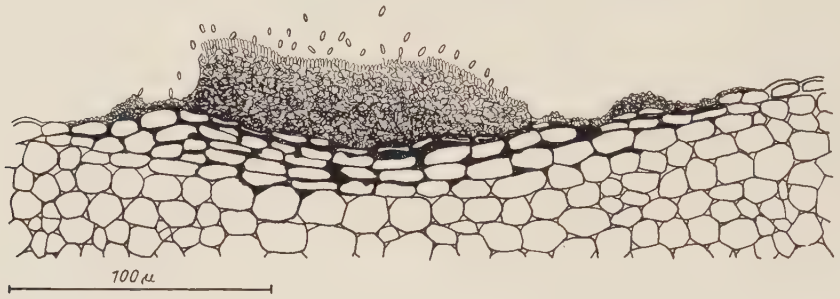

Abb. 6. Querschnitt durch einen anthraknosekranken Pfefferminzstengel mit Acervulus an der Oberfläche

2. In vitro

In keinem der zur Kultivierung des Pilzes benutzten Nährmedien konnten Acervuli beobachtet werden. Konidien- und Chlamydosporenbildung traten jedoch bei bestimmten Nährsubstraten, Temperaturen und Wasserstoffionenkonzentrationen mehr oder minder regelmäßig auf. Nachstehende Beschreibungen der morphologischen Beschaffenheit von Konidien, Chlamydosporen und Myzel in vitro beruhen auf Beobachtungen des Pilzes *Sphaceloma menthae* Jenkins Stamm L unter optimalen Bedingungen (Kartoffelagar, Temp. 24 °C, pH 5,5).

Konidienbildung

Makro- und Mikrokonidien, zwei Extreme derselben Sporenform, die miteinander durch Übergänge verbunden sind, sitzen auf kurzen Konidienträgern, die auf den Hyphen gebildet werden. Makrokonidien sind elliptisch, einzellig, selten zweizellig, hyalin, wobei manchmal im fein granulierten Plasma subpolar zwei große Öltröpfchen zu sehen sind. Die Größe der Makrokonidien variiert zwischen 4 bis 8 × 2 bis 4 μ. Die Mikrokonidien sind hyalin, elliptisch oder rund 1 bis 3 × 1 μ groß (Abb. 7).

Chlamydosporenbildung

Die Hyphen bilden manchmal terminal keulenartige Verdickungen, welche sich durch eine Querwand abgrenzen und ihre Wände verstärken. Durch Bil-

dung weiterer Chlamydosporen entstehen kettenartige Gebilde. Diese Chlamydosporen haben eine bräunlich-grüne Färbung, sind kugelig oder eiförmig und enthalten ein grob granuliertes Plasma mit vielen Öltröpfchen. Die Größe der Chlamydosporen variiert von 8 bis 10 × 6 bis 8 μ. Sie keimen mit einer oder zwei Hyphen aus, an denen sich wiederum Chlamydosporen bilden (Abb. 8). Durch dieses Aussprossen der Chlamydosporen entstehen dicht verflochtene Bündel.

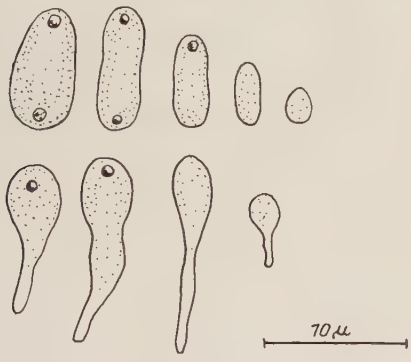

Abb. 7. Konidien von *Sphaceloma menthae*

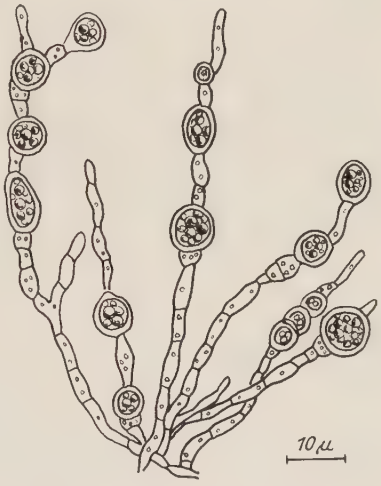

Abb. 8. Chlamydosporen von *Sphaceloma menthae*

Myzel

Die Konidien keimen terminal mit einem Keimschlauch. Daraus beginnt nach etwa 24 Stunden eine deutlich septierte Hyphe zu wachsen. Junge Hyphen sind hyalin und entwickeln sich zuerst nur terminal. Nach etwa drei Tagen beginnt ihre Verzweigung. Ältere Hyphenzellen bekommen eine starke Granulierung, verdickte oder verdoppelte Zellwände und sind braun-rötlich oder bräunlich-grün gefärbt. Die einzelnen Hyphenzellen sind manchmal unregelmäßig geformt, rund oder eiförmig. Auf der Oberfläche der Kolonien entsteht ein rosa, weiß oder grün gefärbter, samtiger Anflug aus septiertem Luftmyzel.

III. Einfluß von Umweltfaktoren

1. Nährsubstrate

Bei zahlreichen parasitischen Pilzen konnte man durch Züchtung auf bestimmten Nährböden besondere Kulturrassen unterscheiden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Untersuchungen die Kulturansprüche beider Stämme von *Sphaceloma menthae* auf sterilen Pflanzenteilen, komplexen und definierten Nährsubstraten geprüft. Es wurden Wachstum, Färbung, Myzelstruktur, Konidien- und Chlamydosporenbildung beider Stämme untersucht. Es galt, ein Nährmedium zu finden, auf dem beide Stämme gut wachsen und sporulieren. Dieses sollte für weitere Versuche über Temperatur- und pH-Abhängigkeit verwendet werden.

Methodik

Die Zusammensetzung der Nährsubstrate war:

Sterile Pflanzenteile:

Pfefferminzstengel, Weizen-, Roggen-, Gerste- und Haferhalmstücke wurden in Reagenzröhrchen, die jeweils 3 ml dest. Wasser enthielten, dreimal bei 100 °C sterilisiert und anschließend mit Myzelstücken beimpft.

Komplexe Nährlösungen:

Preßsaftagar: 100 ml Preßsaft aus gefrorenen Pfefferminzblättern und -stengeln wurden dreimal auf 60 °C erhitzt und vor dem Ausgießen in Petrischalen mit 50 ml 6%igem flüssigem Wasseragar gemischt.

Biomalzagar: 40 g Malzextrakt, 5 g Pepton und 20 g Agar in 1 Liter Knopscher Nährlösung (SCHROPP 1950).

Haferflockenagar: 60 g Haferflocken wurden in 1 Liter Wasser gekocht, durch ein Tuch filtriert, unter Zugabe von 20 ml Fleischextraktbrühe (JANKE 1946), 15 g Dextrose und 20 g Agar auf 1 Liter Wasser aufgefüllt.

Kartoffelagar: 200 ml Kartoffelsaft, 10 ml Fleischextraktbrühe, 15 g Dextrose und 12 g Agar auf 450 ml Wasser aufgefüllt.

Bierwürzeagar: (SCHNEIDER 1958).

Erdagar: 500 ml Erddekokt, 500 ml Wasser, 20 g Agar.

Definierte Nährböden:

Skinner-Nähragar nach SKINNER (1956) + 20 g Agar.

Alle Nährsubstrate, außer Preßsaftagar, wurden dreimal bei 100 °C sterilisiert. Die pH-Einstellung erfolgte mit 0,1 n KOH und 0,1 n HCl, für pH-Messungen wurde Lyphan-indikatorpapier verwendet. Die ausgegossenen Petrischalen wurden mit einem ausgestanzten, runden Myzelstück (Korkbohrer Durchmesser 5 mm) in der Mitte beimpft und drei Wochen bei 24 °C bebrütet.

Ergebnisse

Pfefferminzstengel, Weizen-, Roggen-, Gerste- und Haferhalme

Beide Stämme bildeten reichlich Myzel mit viel Chlamydosporen und wenig Konidien. Stamm L färbte Stengel und Halme braun, es entstanden erhobene Myzelhäufchen mit einem rosa und weißen Anflug. Der Stamm 487 überwuchs das Substrat mit einem braunen Belag.

Preßsaftagar: Stamm L bildete gerunzelte graubraune Kolonien mit einem rosa Anflug, viele Chlamydosporen und wenig Konidien. Stamm 487 hatte dunkelbraune, flache, radial gefaltete Kolonien, die Chlamydosporen- und Konidienbildung war gering.

Biomalzagar (Abb. 9 A und 9 B): Beide Stämme wuchsen sehr kräftig, es entstanden hocherhobene Kolonien. Beim Stamm L waren sie grob gerunzelt, in der Mitte bräunlich-grau und am Rande hellbraun. Beide Stämme bildeten viele Chlamydosporen und keine Konidien.

Bierwürzeagar: Wachstum und Farbe des Myzels waren ähnlich wie auf dem Biomalzagar.

Haferflockenagar (Abb. 9 E und 9 F): Der Stamm L bildete in der Mitte erhobene, radialgefaltete, mit einem samtartigen rosa Anflug bedeckte Kolonien. Der Stamm 487 hatte ebenso gefaltete, flache Kolonien

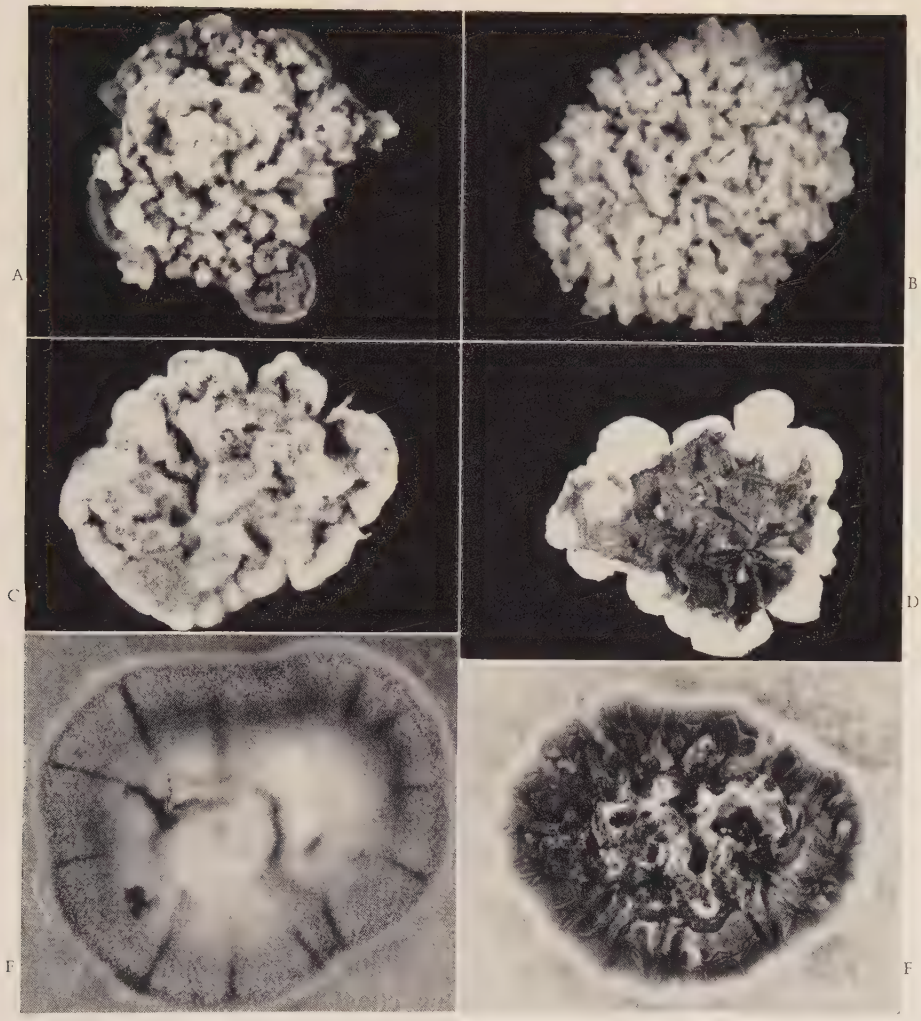

Abb. 9. Kolonien von *Sphaceloma menthae*. A, C, E = Stamm L; B, D, F = Stamm 487. Nährböden von oben nach unten: Biomalzagar, Kartoffelagar, Haferflockenagar

mit dunkelroter bis rötlichbrauner Färbung. Beide Stämme bildeten reichlich Konidien und Chlamydosporen, doch überwog beim Stamm L die Chlamydosporenbildung.

K a r t o f f e l a g a r (Abb. 9 C und 9 D): Auch hier zeigten beide Stämme gutes Wachstum und Unterschiede in Form und Farbe ihrer Kolonien. Stamm L bildete erhobene, grob und unregelmäßig gerunzelte, grau gefärbte Kolonien, mit einem rosa Anflug, der in weiß und grün überging. Der Agar färbte sich gelblich-grün und fluoreszierte im UV-Licht hellgrün. Es gab viele Makro- und Mikrokonidien sowie lange Ketten von Chlamydosporen. Stamm 487 hatte kompakte, in der Mitte erhobene

und am Rande gefaltete, rötlich-braune Kolonien, deren Oberfläche feucht glänzte, viele Konidien und viele Chlamydosporen.

Erdagar: Beide Stämme bildeten eine dünne, hautartige Myzelschicht, die beim Stamm L rötlich und beim Stamm 487 bräunlich gefärbt war. Es konnten wenige Chlamydosporen, aber keine Konidien beobachtet werden.

Wasseragar: Das Wachstum beider Stämme war sehr schwach, der Stamm L färbte den Agar rötlich und der Stamm 487 hellbraun.

Skinner-Nähragar: Beide Stämme bildeten kleine punktartige Kolonien, wenig Chlamydosporen und keine Konidien.

Auf den verwendeten Nährböden verhielten sich beide Stämme verschieden und zeigten deutliche Unterschiede in Farbe, Myzelstruktur und in der Intensität der Konidien- und Chlamydosporenbildung. Das Wachstum erfolgte auf allen geprüften Substraten nur langsam, 5 bis 7 mm in acht Tagen. Selbst nach zweimonatigem Aufbewahren der Kulturen bei optimalen Temperaturen und in feuchten Kammern, um das Austrocknen des Substrates zu verhindern, bewuchs der Pilz die Agarplatten nicht ganz. Wegen einer Gefahr von Fremdinfektionen wurden alle Versuche nach drei Wochen ausgewertet. Eine gegenseitige Hemmung oder Förderung bei gleichzeitigem Impfen beider Stämme auf eine Haferflockenagarplatte war nicht zu beobachten.

Die Verwertung einiger Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen mit und ohne Zusatz von Aneurin

Parasitierende Pilze sind zur Deckung ihres Kohlenstoff- und Stickstoffbedarfes auf Kohlenstoff- und Stickstoffquellen der Wirtspflanze angewiesen. Es sollte festgestellt werden, welche von den angebotenen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen von den beiden *Sphaceloma-Stämmen* am besten verwertet werden können, ob ein Aneurinbedarf, wie es bei vielen parasitischen Pilzen bekannt ist, auch bei *Sphaceloma menthae* besteht und ob irgendwelche ernährungsphysiologische Unterschiede zwischen den beiden Stämmen auftreten.

Methodik

Die Grundnährlösungen wurden nach der Methode von SCHWEIZER (1958) zusammengesetzt. Zugegeben wurden je Liter Grundnährlösung jeweils 20 g Kohlenstoff bzw. Stickstoff in Form der in Tabelle 2 angegebenen Substanzen. Der Vitaminzusatz betrug 1 mg Aneurin-Hydrochlorid auf 1 Liter Nährlösung. Der pH-Wert 5,5 wurde mit 0,1 n KOH und 0,1 n HCl eingestellt, für die pH-Messungen ist Lyphanindikatorpapier verwendet worden. Reinheitsgrad der Chemikalien: pro analysi. Je Versuchsglied und -variante wurden zehn Reagenzröhrchen mit 3 ml der entsprechenden Nährlösung abgefüllt und dreimal bei 100 °C im Dampftopf sterilisiert. Aus Kartoffelagarplatten mit drei Wochen alten Kulturen wurden für beide Stämme Myzelstücke mit einem 5 mm-Korkbohrer ausgestanzt und in die mit Nährlösungen gefüllten Reagenzgläser eingeimpft. Die Kulturen wurden bei 24 °C bebrütet und das Myzelwachstum nach vier Wochen mit einer 5-Stufen-Skala bonitiert.

Tabelle 2 gibt die Ergebnisse wieder. Die zugegebenen Kohlenstoffquellen wurden mit Ausnahme von Inosit gut verwertet. Stamm L bevorzugte

Glukose, Laevulose, Maltose und Raffinose. Von organischen Stickstoffverbindungen waren für den Stamm L Cystin und Valin die besten, während Stamm 487 am besten auf Asparagin, Glykokoll, Leucin und Valin angesprochen hat. Anorganische Stickstoffverbindungen wurden vom Stamm L schlechter verwertet als vom Stamm 487, doch war sec. Ammoniumphosphat für beide Stämme die beste anorganische Stickstoffquelle. Die Stämme zeigten einige Unterschiede in der Ausnutzungsfähigkeit der einzelnen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen.

2. Temperatur

Beide *Sphaceloma menthae*-Stämme wurden in Petrischalen auf dem besonders geeigneten Kartoffelagar im Reihenthermostaten bei verschiedenen Temperaturen kultiviert. Der Versuch wurde nach drei Wochen auf Koloniengröße, Konidien- und Chlamydosporenbildung als Kriterium für Wachstum und Sporulierung ausgewertet. Die Stämme zeigten bei verschiedenen Temperaturen unterschiedliche Färbung der Kolonien. Die Farben wurden nach den Normen des Pflanzenfarbenatlas von Biesalski (1957) angegeben, jedoch gaben auch diese nur den angenäherten Farbton wieder. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 3 und Abbildung 10 zusammengestellt.

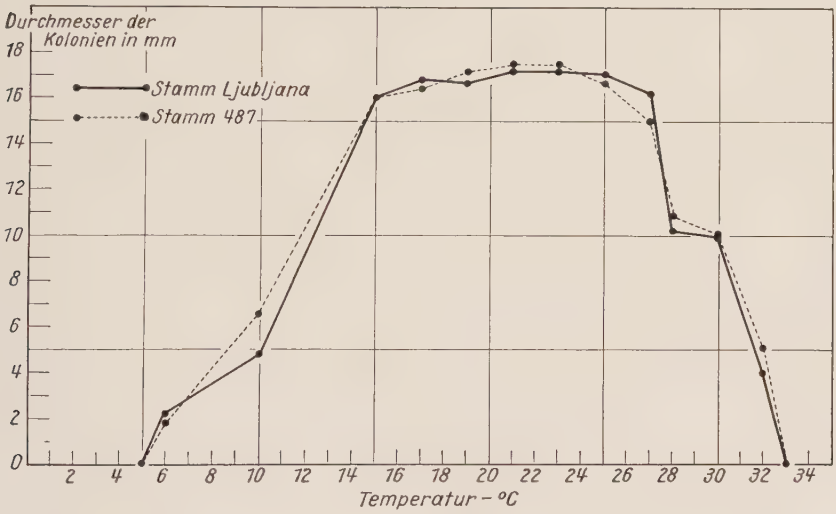

Abb. 10. Myzelwachstum von *Sphaceloma menthae* bei verschiedenen Temperaturen. Stamm L und Stamm 487 auf Kartoffelagar

Im Bereich von 15 bis 27 °C wuchsen beide Stämme gut, das Optimum lag für den Stamm L zwischen 21 und 25 °C und für den Stamm 487 zwischen 19 und 23 °C. Bei niederen und hohen Temperaturen 6 bis 10 °C und 28 bis 32 °C wuchs Stamm L schlechter als Stamm 487. Das Optimum für die Konidienbildung lag für beide Stämme zwischen 19 und 23 °C. Die Chlamydosporenbildung war sehr stark bei niedrigen und hohen Temperaturen und stand im umgekehrten Verhältnis zur Konidienbildung.

3. Wasserstoffionenkonzentration

Die Wasserstoffionenkonzentration des Nährmediums bestimmt weitgehend die Entwicklung der Mikroorganismen. Die Versuche wurden mit beiden Stämmen in Petrischalen auf Kartoffelagar durchgeführt.

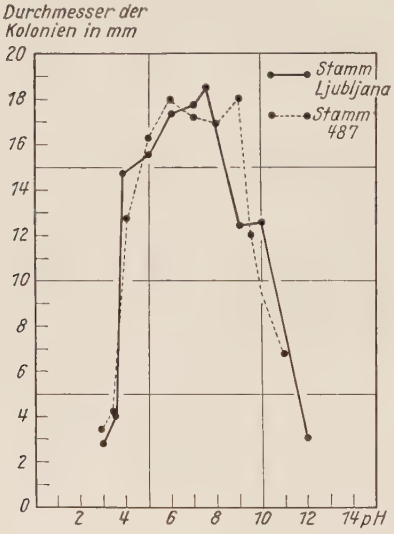

Abb. 11. Myzelwachstum von *Sphaceloma menthae* bei verschiedenen pH-Stufen. Stamm L und Stamm 487 auf Kartoffelagar

Die gewünschten pH-Werte wurden mit 0,1 n KOH und 0,1 n HCl eingestellt und nach dem Sterilisieren überprüft. Für die pH-Messungen ist Lyphanindikatorpapier verwendet worden. Die Platten wurden mit runden Myzelstücken beider Stämme beimpft und bei 24 °C bebrütet. Die Versuchsdauer betrug jeweils drei Wochen.

Bei beiden Stämmen begann das Myzelwachstum bei einem pH-Wert von etwa 3,0; das Optimum erstreckte sich für den Stamm L über einen Bereich von pH 5,5 bis 7,5 und für den Stamm 487 von pH 5,0 bis 9,0. Viele Konidien wurden von beiden Stämmen zwischen pH 5,0 und pH 6,5 gebildet. Mit der Abnahme der Konidienbildung stieg die Chlamydosporenbildung, die aber in extremen Wasserstoffionenkonzentrationen wieder gering wurde. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 4 und Abbildung 11 zusammengestellt.

IV. Biologie des Pilzes

1. Konidienkeimung

Für das epidemische Potential eines Erregers bieten Studien des Keimungsverlaufes seiner Vermehrungsorgane unter verschiedenen Umweltbedingungen einige Anhaltspunkte. So wurde die Abhängigkeit der Konidienkeimung von der Temperatur in verschiedenen Medien untersucht und Unterschiede in der Keimungsphysiologie beider *Sphaceloma menthae*-Stämme festgehalten. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Die Untersuchungen ergaben, daß beide Stämme innerhalb des Temperaturbereiches 20 bis 27 °C gut keimen und sich um 25 °C ein deutliches Temperaturoptimum abzeichnet. Im Keimverhalten beider Stämme traten Unterschiede auf, Stamm L war weniger keimwillig. Preßsaft und destilliertes Wasser mit einer Zugabe von Kaliumzitrat oder Glukose verbesserten die Keimfähigkeit beider Stämme.

2. Inkubation

Beobachtungen der Anthraknoseerkrankungen an Pfefferminze im Gebiet Ljubljansko Barje lassen vermuten, daß die Ausbreitungsgeschwindigkeit im Bestande deutlich von klimatischen Faktoren (Temperatur und Feuchtigkeit)

Tabelle 2

Die Verwertung einiger Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen durch *Sphaceloma menthae* Jenkins (Stamm L und Stamm 487) mit und ohne Zusatz von Aneurin

	Sphaceloma menthae Jenkins			
	Stamm L		Stamm 487	
	+	—	+	—
Kohlenstoffquelle				
Kartoffelnährlösung	4	4	4	4
Arabinose	3	3	3	3
Dulcit	2	2	2	2
Galactose (+ H_2O)	3	3	3	3
Glukose (+ H_2O)	4	4	4	4
Inosit (+ H_2O)	1	1	1	1
Inulin	3	3	2	2
Laevulose	3	3	4	4
Maltose (+ H_2O)	3	3	4	4
Mannit	4	4	3	3
Lactose (+ H_2O)	3	2	3	3
Raffinose (+ 5 H_2O)	2	2	4	4
Saccharose	2	2	3	3
Sorbit	3	2	3	3
Stärke	4	4	3	3
Stickstoffquelle				
Kartoffelnährlösung	4	4	4	4
Ammoniumnitrat	0	0	0	0
Ammoniumoxalat	1	1	1	1
Ammoniumphosphat sec.	3	3	4	4
Asparagin	1	1	1	1
Cystin	4	4	4	4
Glykokoll	2	2	3	3
Glutamin	2	2	4	4
Guanidin	0–1	0–1	0	0
Kaliumnitrat	0	0	1–2	1–2
Natriumnitrat	2	2	3	3
Leucin	3	3	4	4
Tyrosin	3	3	4	4
Valin	4	4	4	4

Die Bonitierungszahlen stellen das Mittel aus zehn Wiederholungen dar. + = mit Aneurinzusatz, — = ohne Aneurinzusatz, 0 = kein Wachstum, 1 = geringes Wachstum, 2 = mäßiges Wachstum, 3 = gutes Wachstum, 4 = sehr gutes Wachstum (etwa 3 ml dichte Myzelmasse).

abhängig ist. In den Sommermonaten Juni bis August mit hohen durchschnittlichen Temperaturen von 17,9 bzw. 19,8 bzw. 18,8 °C (langjähriges Mittel) und vielen Niederschlägen wird die Vermehrung des Pilzes begünstigt. Zur Klärung des Einflusses von Feuchtigkeit und Temperatur auf die Infektion

Tabelle 3

Temperatureinfluß auf die Konidien- und Chlamydosporenbildung sowie Färbung der Kolonien

Temperatur °C	Konidienbildung	Chlamydosporenbildung	Färbung der Kolonien	
		Stamm L		
5	—	—	—	—
6	—	+++	grau	1,5 U
10	—	+++	grau	2 U
15	+	+++	grau	2 U
17	++	+++	grau	2 U
19	+++	++	grau	2 U
21	+++	+++	grau	2 U
23	+++	+++	hellgrau	2 P
25	++	+++	grau + rosa	2 U
27	+	+++	grau + rosa	2 U
28	+	+++	hellgrau	2 U
30	—	+++	hellgrau	2 U
32	—	+++	hellgrau	2 U
33	—	—	—	—
		Stamm 487		
5	—	++	hellbraun	4 K
6	—	+++	hellbraun	4 K
10	—	+++	rotbraun	7 R
15	+	+++	rotbraun	7 R
17	++	++	rotbraun	7 R
19	+++	++	dunkelrot	7,5 W
21	+++	++	dunkelrot	7,5 W
23	+++	++	dunkelrot	7,5 W
25	++	++	rotbraun	7 W
27	++	++	hellbraun	4 J
28	+	+++	hellbraun	4 J
30	—	+++	hellbraun	3 Q
32	—	++	braun	4 Q
33	—	—	—	—

Zeichenerklärung zu Tabellen 3 und 4: + = geringe Konidienbildung, ++ = mäßige Konidienbildung, +++ = gute Konidienbildung. Für Chlamydosporenbildung gilt das gleiche. Farbenbezeichnung nach BIESALSKI (1957).

mit *Sphaceloma menthae* wurden im Gewächshaus Versuche durchgeführt und zwar stets mit beiden Stämmen. Als Kriterium dienten Inkubationszeit und Befallsstärke.

a) Einfluß der Feuchtigkeit

Das Auftreten der Krankheit wird begünstigt, wenn mehrere Tage hindurch Nebelfelder relativ hohe Luftfeuchtigkeit verursachen. Diese Voraus-

Tabelle 4

Einfluß verschiedener pH-Werte auf die Konidien- und Chlamydosporenbildung sowie Färbung der Kolonien

pH	Konidienbildung	Chlamydosporenbildung	Färbung der Kolonien	
		Stamm L		
3,0	—	++	gelborange	3 C
3,5	—	+++	gelborange	3 J
4,0	+	+++	braungrau	2 U + 2 W
4,5	++	+++	grau mit rosa Anflug	2 U + 4 H
5,0	+++	+++	grau mit rosa Anflug	2 U + 4 H
5,5	+++	++	grau mit rosa Anflug	6 H + 2 U
6,0	+++	++	grau mit rosa Anflug	4 U + 4 H
6,5	++	+++	grau mit rosa Anflug	4 U + 4 H
7,0	++	+++	grau mit rosa Anflug	3 U + 5 H
7,5	++	+++	grau mit rosa Anflug	4 U + 4 H
8,0	+	+++	grau mit rosa Anflug	3 U + 3 H
9,0	—	+++	grau mit rosa Anflug	3 U + 1 Q + 5 H
10,0	—	+++	grau mit rosa Anflug	2 U
11,0	—	++	hellbraun	3 J
12,0	—	+	hellbraun	3 J
		Stamm 487		
3,0	—	++	hellbraun	5 J
3,5	—	+++	hellbraun	5 J
4,0	—	+++	hellbraun	3 J
4,5	+	++	hellbraun	3 J
5,0	++	++	rötlichbraun	7 W
5,5	+++	+	rötlichbraun	7 W
6,0	+++	+	rötlichbraun	7 W
6,5	+++	++	rötlichbraun	7 W
7,0	+++	++	rötlichbraun	7 W
7,5	++	++	rötlichbraun	7 W
8,0	++	+++	rötlichbraun	6 P
9,0	+	+++	rötlichbraun	6 P
10,0	—	+++	hellbraun	3 J
11,0	—	++	hellbraun	3 J
12,0	—	++	hellbraun	3 C

setzung ist in Moorgebieten besonders oft gegeben. So lag es nahe, auch für künstliche Infektionen hohe relative Feuchtigkeit zu wählen. Im nachstehenden Versuch wurden deshalb die Pflanzen nach dem Besprühen mit einer wäßrigen Sporensuspension für 24, 48 oder 72 Stunden in einen Infektionskasten mit 100 % r. F. gestellt und anschließend für die restliche Versuchsdauer der drei Wochen im Gewächshaus bei etwa 80 % r. F. belassen. Zur Kontrolle wurde ein Versuchsglied nicht in den Beregnungskasten gestellt.

Tabelle 5

Konidienkeimung von *Sphaceloma menthae* (Stamm L und Stamm 487) in verschiedenen Medien nach 24 Stunden in Prozenten ausgedrückt

°C	dest. Wasser		dest. Wasser + 10^{-3} Glukose		dest. Wasser + 10^{-3} K-zitrat		Preßsaft	
	L	487	L	487	L	487	L	487
5	0	0	0	0	0	0	0	0
10	4	6	6	7	4	8	5	7
12	12	14	14	14	16	18	15	16
15	30	50	38	52	44	60	34	58
18	48	72	55	70	49	73	50	72
20	60	87	76	88	89	90	78	91
25	78	91	87	96	84	98	84	94
27	62	89	70	90	74	93	70	89
30	21	24	24	30	26	37	24	29
33	0	0	0	2	0	5	0	0

Versuchsglieder	Befallsstärke
1. 21 Tage r. F. 80 %	kein Befall
2. 24 Std. r. F. 100 % anschließend etwa 80 %	geringer Befall
3. 48 Std. r. F. 100 % anschließend etwa 80 %	starker Befall
4. 72 Std. r. F. 100 % anschließend etwa 80 %	starker Befall

Temperatur etwa 20 °C, Versuchsdauer 21 Tage.

Je Versuchsglied wurden fünf Töpfe mit jeweils 4 Kopfstecklingen angesetzt und nach vier Wochen mit einer wäßrigen Sporenaufschwemmung infiziert. Die Kontrollen blieben gesund, eine 24stündige Aufbewahrung der Pflanzen im Infektionskasten bewirkte geringen Befall und eine 48 oder 72 Stunden andauernde hohe Luftfeuchtigkeit verursachte starken Befall. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Stämmen beobachtet werden.

b) Einfluß der Temperatur

Die relativ starke Ausbreitung der Anthraknose in den Sommermonaten ist außer von der Feuchtigkeit auch von der Temperatur abhängig. BAINES (1938) untersuchte an *Mentha pip.* var. *vulgaris* Sole den Einfluß verschiedener Temperaturen (15,6; 21; 26,8; 32,1 °C) auf den *Sphaceloma menthae*-Befall. Eine befriedigende Infektion trat in seinem Versuch bei Temperaturen von 21 und 26,8 °C auf. Im Ljubljansko Barje kommen mittlere Temperaturen, die weit über 20 °C liegen, selten vor. Die Werte für die wärmsten Monate des Jahres liegen im langjährigen Durchschnitt für Juni bei 17,9, für Juli bei 19,8, für August bei 18,8 °C. Da bereits bei Temperaturen um 16 °C die ersten Infektionen beobachtet werden konnten, sollte in eigenen, im Gewächshaus durchgeführten Versuchen ein niedriger Temperaturbereich von 5, 12, 16, 20 und 22 °C geprüft werden.

Die Pflanzen wurden wie im vorstehenden Versuch aufgezogen, infiziert und für 48 Stunden in den Infektionskasten gestellt.

Versuchsglieder	Befallsstärke	Inkubationszeit
1. Temperatur 5 °C	kein Befall	—
2. Temperatur 12 °C	kein Befall	—
3. Temperatur 16 °C	geringer Befall	14 Tage
4. Temperatur 20 °C	starker Befall	8 bis 10 Tage
5. Temperatur 22 °C	starker Befall	8 bis 10 Tage

Versuchsdauer 3 Wochen.

Bei 20 und 22 °C waren die Pflanzen stark befallen und zeigten 8 bis 10 Tage nach der Infektion die ersten Krankheitssymptome. Eine Temperatur von 16 °C verlängerte die Inkubationszeit. Die ersten Krankheitssymptome konnten hier erst nach 14 Tagen beobachtet werden, der Befall war gering. Bei 5 und 10 °C trat bis zum Versuchsende kein Befall auf.

Die Inkubationsversuche zeigen, daß eine starke Infektion nur dann möglich ist, wenn die Pflanzen für mindestens 48 Stunden in absolut feuchtem Raum gehalten werden. Die Infektion ist temperaturabhängig und beginnt bei etwa 16 ° C. Mit steigender Temperatur verkürzt sich die Inkubationszeit. Das Optimum dürfte bei 22 °C liegen. Beide Stämme zeigten gleiche Temperaturansprüche.

3. Pathogenität

Mit verschiedenen *Mentha*-Arten wurden im Gewächshaus Untersuchungen über die Anfälligkeit für *Sphaceloma menthae* durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6

Anfälligkeit verschiedener *Mentha*-Arten für *Sphaceloma menthae* Jenkins Stamm L und Stamm 487

Art	Befallsgrad	Fleckengröße		Fleckenform	
		Stengel in mm ⌀	Blatt	Stengel	Blatt
Mentha arvensis L.	3	2 - 3	1 – 2	elliptisch	rund
Mentha aquatica L.	2	1 – 2	0,5 – 1	elliptisch	rund
Mentha gattefosei	2	1 – 2	1 – 2	elliptisch	rund
Mentha longifolia (L.) Hudson	2	1 – 2	1 – 2	elliptisch	rund
Mentha piperita L. Mitcham.	3	2 – 5	1 – 3	elliptisch	rund
Mentha pip. var. *crispula* Wendenroth	2	1 – 3	1 – 2	elliptisch	rund
Mentha pulegium L.	2	0,5 – 2	0,5 – 1	elliptisch	rund
Mentha rotundifolia L.	1	0,5 – 2	0,5 – 1	elliptisch	rund
Mentha spicata L. em Hudson	2	2 – 3	1 – 2	streifig	rund
Mentha spicata var. *crispata* Schrader	2	1 – 3	1 – 3	elliptisch	rund
Mentha suavis Gussone	1	0,5 – 2	0,5 – 1	streifig	rund
Mentha verticillata L.	2	1 – 2	1 – 2	elliptisch	rund

1 = geringer Befall; 2 = mäßiger Befall; 3 = starker Befall.

Methodik

Jeweils zehn gleichaltrige Pflanzen nachstehender zwölf *Mentha*-Arten wurden mit einer Sporensuspension von *Sphaceloma menthae* Jenkins, Stamm 487 und Stamm L, mit Hilfe einer Fixativspritze besprüht und für 48 Stunden in eine feuchte Kammer bei einer Gewächshaustemperatur von ± 20 °C gestellt. Die Inkubationszeit lag bei allen geprüften Arten und für beide Stämme zwischen acht bis zehn Tagen. Vier Wochen nach Auftreten der ersten Symptome wurde der Versuch ausgewertet.

Der Versuch bestätigte, daß alle geprüften *Mentha*-Arten für *Sphaceloma menthae* anfällig sind. Im Befallsgrad und Befallsbild zeigten sich jedoch einige Unterschiede. Am stärksten wurden *Mentha piperita* Mitcham, *Mentha arvensis* und *Mentha spicata* befallen. Bei *M. spicata* und *M. suavis* flossen die Flecke auf den Stengeln in Streifen zusammen, bei anderen Arten blieben sie elliptisch. Bei den behaarten Arten lagen die meisten Flecke auf den wenig behaarten Blattadern. Die Ergebnisse zeigten, daß eine stärkere Behaarung die Infektion verringern kann (*M. pulegium, M. suavis, M. rotundifolia*).

4. Überwinterung

Trotz wiederholter Beobachtungen und mikroskopischer Untersuchungen der im Freiland überwinternden, von *Sphaceloma menthae* befallenen Pfefferminzstoppeln, konnten keine Fruktifikationsorgane einer höheren Fruchtform gefunden werden. Isolationsversuche aus den befallenen, abgestorbenen Stengeln mißlangen ebenfalls, weil solche Pflanzenreste von saprophytischen Pilzen besiedelt waren. Bei diesen Abimpfungen überwucherten die Saprophyten das gesamte Nährmedium, bevor *Sphaceloma* sichtbar wurde. Es gelang jedoch, den Pilz aus den nicht abgestorbenen, triebfähigen, oberirdischen Ausläufern, welche im Vorjahr infiziert worden waren und im Freiland überwintert hatten, zu isolieren. Zur Prüfung der Überwinterungsfähigkeit von Pilzhyphen im befallenen Pflanzengewebe wurden künstlich infizierte Blätter, welche auf den entstandenen Flecken keine Konidienlager trugen, in einer Kühltruhe bei — 20 °C aufbewahrt und von diesen in zweiwöchigen Abständen Isolierungen durchgeführt. Selbst nach dreimonatiger Lagerung bei so niedriger Temperatur wuchs der Pilz aus Blatt- und Stengelstücken auf Kartoffelagar wieder aus dem Gewebe heraus und bildete Kolonien. Daraus darf geschlossen werden, daß *Sphaceloma menthae* in befallenen, aber nicht abgestorbenen Pflanzenorganen in latenter Form, wahrscheinlich in Form dickwandiger, chlamydosporenartiger Zellen, überwintern und im nächsten Jahr, sobald günstige klimatische Voraussetzungen vorliegen, weiter wachsen und nach dem Sporulieren junge Triebe infizieren kann.

5. Übertragung

Aus den vorstehenden Abschnitten ergeben sich für die Übertragung von *Sphaceloma menthae* drei Möglichkeiten: 1. Überwinternde, oberirdische Ausläufer stellen, sofern sie mit *Sphaceloma menthae* infiziert wurden, eine Infektionsquelle für neu austreibende Sprosse dar. 2. Werden infizierte Ausläufer als Pflanzgut für neu anzulegende Kulturen verwendet, so wird mit dem Pflanzgut auch die Anthraknose verbreitet. 3. Von infizierten Beständen

ist eine Ansteckung der gesunden Pflanzen in Nachbarparzellen durch Konidien wahrscheinlich. 4. Eine weitere Befallsmöglichkeit besteht durch andere Wirtspflanzen des Pilzes. Die oben beschriebenen Infektionsversuche an verschiedenen *Mentha*-Arten haben ergeben, daß auch ausgesprochene Unkräuter wie *Mentha arvensis*, *Mentha longifolia* und *Mentha aquatica* an Anthraknose erkranken. Ein Übergang des Pilzes von diesen Unkräutern auf Pfefferminzkulturen ist daher leicht möglich.

D. BEKÄMPFUNG

I. Mechanische Bekämpfung

Bei dem starken Ausmaß des durch *Sphaceloma menthae* Jenk. verursachten Schadens ist es unumgänglich, eine Bekämpfung vorzunehmen. Einerseits läßt sich der Befall einschränken, indem man nur gesundes Pflanzenmaterial verwendet und den Standort der Kulturen häufig wechselt, anderseits ist eine Bekämpfung der Krankheit mit mechanischen Maßnahmen oder mit chemischen Mitteln möglich. Die mechanische Bekämpfung des Pilzes hat man bereits in den USA erfolgreich beschritten. So empfehlen Baines (1938) und Westcott (1950), neuerdings auch das Bulletin Mint Farming (1954) ein Umpflügen der Stoppeln nach dem Schnitt im Herbst.

II. Chemische Bekämpfung

Über die chemische Bekämpfung der Pfefferminzanthraknose liegen nur wenige Angaben vor. Mint Farming (1954) empfiehlt eine Anwendung von Kupferkalk oder eine Behandlung mit Bordeauxbrühe.

Zur Bekämpfung anderer *Sphaceloma*-Arten, die zum Teil recht deutliche Schäden verursachen, sind eingehendere Untersuchungen durchgeführt worden. So wird gegen *Sphaceloma ampelinum* (*Elsinoë ampelina*) eine Behandlung mit Bordeauxbrühe (Coombe 1954), Thiuram oder Ziram (Taylor 1954) bzw. mit Zineb, Maneb oder Ferbam (Andrade 1958) empfohlen. Gaudineau (1954) hat bei Winterspritzungen mit DNC Erfolg gehabt. Bei der Anthraknose der *Citrus*-Arten werden meistens Behandlungen mit Bordeauxbrühe empfohlen, doch haben sich auch Dithane-M, Captan und Fermate bewährt (Ferreira 1958). *Sphaceloma rosarum* wird mit Thiuram oder Zineb bekämpft (Wade 1956).

1. Plattentest

Zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Bekämpfungsmittel auf *Sphaceloma menthae* wurde zwecks allgemeiner Orientierung ein Plattentest auf Biomalzagar angelegt. Es wurden 14 Fungizide ausgewählt und zwar wurde außer der in der Vorschrift (Pflanzenschutzmittelverzeichnis 1959) jeweils empfohlenen Konzentration eine dreimal geringere und die dreifache genommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Methodik

Der Biomalzagar wurde wie auf der Seite 160 angegeben vorbereitet. Je Petrischale wurden 19 ml Nährboden genommen, dem bei Ausgießen in die Petrischalen 1 ml des Fungizids zugegeben wurde. Die entsprechenden Lösungen sind vorher so berechnet worden,

Tabelle 7

Die Wirkung verschiedener Fungizide auf das Wachstum von *Sphaceloma menthae* im Plattentestversuch

Mittel	Fungizidgruppe	Zuwachs in mm		
		Konzentration	Stamm Ljublj. $\bar{x} \mid s\bar{x}$	Stamm 487 $\bar{x} \mid s\bar{x}$
1 Kontrolle	—	—	17,8 ± 1,5	18,0 ± 1,3
2 Vitigran	Kupferoxychlorid (45 bis 50 % Cu)	0,15	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
		0,5	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
		1,0	0,0 ± —	0,0 ± —
		3,0	0,0 ± —	0,0 ± —
3 Collavin	Kupferoxydul (35 % Cu)	0,15	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,0
		0,5	0,0 ± —	0,0 ± —
		1,0	0,0 ± —	0,0 ± —
		3,0	0,0 ± —	0,0 ± —
4 Brestan	Organische Zinnverbindung	0,1	3,0 ± 0,3	2,0 ± 0,1
		0,3	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,0
		0,9	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
5 Dithane	Zinkäthylen-bis-dithiocarbamat	0,06	9,2 ± 1,1	9,5 ± 0,9
		0,2	4,8 ± 0,4	5,7 ± 0,3
		0,6	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
6 Dithane-M	Mangan-äthylen-bis-dithiocarbamat	0,06	3,5 ± 0,3	4,0 ± 0,0
		0,2	0,5 ± 0,0	2,6 ± 0,3
		0,6	0,0 ± —	0,0 ± —
7 Ferbam	Eisendimethyldithiocarbamat	0,06	7,8 — 1,2	8,0 ± 0,2
		0,2	0,1 ± 0,0	0,2 + 0,0
		0,6	0,0 ± —	0,0 ± —
8 Fuclasin-Ultra	Zinkdimethyldithiocarbamat	0,06	3,2 ± 0,4	2,8 ± 0,4
		0,2	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,0
		0,6	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0
9 Pomarsol-forte	Tetra-Methyl-Thiuram-Disulfid (TMTD)	0,06	2,4 ± 0,3	3,0 ± 0,0
		0,2	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1
		0,6	0,0 ± —	0,0 ± —
10 Lutiram BASF	Di-Pyrollidyl-Thiuram-Disulfid (DPTD)	0,16	2,0 ± 0,0	3,2 ± 0,1
		0,5	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,0
		1,5	1,0 ± 0,0	1,5 ± 0,1
11 Polyram	Poly-Äthylen-Thiuram-Disulfid (PÄTD)	0,1	7,5 ± 1,3	10,0 ± 1,0
		0,3	7,0 ± 1,0	7,4 ± 0,8
		0,9	5,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0
12 Orthocid-50	Chlormethylthiophthalimid (Captan)	0,08	5,0 ± 0,0	5,8 ± 0,3
		0,25	5,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0
		0,75	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
13 Orthocid-83	Chlormethylthiophthalimid (Captan)	0,05	5,2 ± 1,2	4,8 ± 0,4
		0,15	3,6 ± 1,1	5,0 ± 0,0
		0,45	3,0 ± 0,4	3,0 ± 0,0
14 Karathane	Dinitro-alkylphenyl-crotonat	0,03	4,0 ± 1,0	4,5 ± 0,2
		0,1	3,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0
		0,3	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,1
15 Nirit conc.	Rhodandinitrobenzol	0,06	4,7 ± 0,4	5,0 ± 0,0
		0,2	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0
		0,6	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1

Die Zahlen stellen das Mittel aus fünf Wiederholungen dar. Versuchsdauer vier Wochen.

daß bei einer Verdünnung die zu prüfenden Aufwandmengen hergestellt waren. Mit einem 5-mm-Korkbohrer wurden aus jeder Testplatte fünf Ausstiche ausgehoben und durch ein gleich großes Myzelstück aus einer Biomalzplatte ersetzt. Getestet wurden die Stämme L und 487 in jeweils fünf Wiederholungen je Fungizid und Konzentration[1]). Die Versuchsdauer betrug drei Wochen bei 24 °C. Zur Auswertung wurde der Durchmesser der Pilzkolonien gemessen und mit den Kontrollen (Biomalz ohne Fungizid) verglichen.

Alle Präparate in allen Konzentrationen hemmten das Pilzwachstum. Die beste Wirkung wurde mit den Cu-Präparaten Vitigran und Collavin erzielt, welche bereits in einer Konzentration von 0,15 % das Wachstum des Pilzes weitgehend unterbanden. In den üblichen Konzentrationen wirkten auch Ferbam, Fuclasin, Dithane-M und Pomarsol recht gut. Alle Präparate, die in der mittleren Konzentration einen Zuwachs von mehr als 1,4 mm ermöglichten, wurden verworfen.

2. Gewächshausversuche

Methodik

Jedes Versuchsglied bestand aus fünf Gefäßen mit jeweils vier Pflanzen. Die etwa 15 cm großen Pflanzen wurden mit den Fungiziden behandelt und 24 Stunden später mit einer Sporenaufschwemmung besprüht. Nach der Infektion wurden die Gefäße für drei Tage in eine feuchte Kammer (gesättigte Atmosphäre) gestellt und anschließend für 18 Tage im Gewächshaus bei etwa 20 °C belassen. Als Kontrollen wurden sowohl Pflanzen verwendet, die infiziert und mit keinem Mittel behandelt worden waren (kranke Kontrolle), als auch solche, die weder infiziert noch behandelt worden waren (gesunde Kontrolle).

Tabelle 8

Bonitierungen des Gewächshausversuches

Mittel	Konzentration %	Zahl der Pflanzen mit Befallsgrad						Befallsgrad	
		0	1	2	3	4	5	P	Rel.
1. Kranke Kontrolle	0	0	0	5	9	6	0	3,1	100
2. Gesunde Kontrolle	—	0	0	0	0	0	0	—	—
3. Vitigran	0,5	10	6	4	0	0	0	0,7	23
Vitigran	1,0	16	3	1	0	0	0	0,3	10
4. Collavin	0,5	9	5	4	2	0	0	1,0	32
Collavin	1,0	15	3	2	0	0	0	0,4	13
5. Ferbam	0,2	18	2	0	0	0	0	0,1	3
6. Dithane-M	0,2	12	5	3	0	0	0	0,6	19
Dithane-M	0,3	16	2	2	0	0	0	0,3	10
7. Pomarsol	0,2	14	5	1	0	0	0	0,4	13

Die Auswertung des Versuches erfolgte durch Bonitierung des Befalles nach folgendem Schlüssel:

P = Mittel der Einzelbonitierungen; 0 = kein Pilzbefall; 1 = Pflanzen gering befallen; 2 = Pflanzen gering befallen, keine abgestorbenen Blätter; 3 = Pflanzen stark

[1]) Die Streuung wurde nach der Formel $s\bar{x} = \pm \sqrt{\frac{\Sigma a^2}{n(n-1)}}$ errechnet (Ruge 1951).

befallen, teilweise abgestorbene Blätter; 4 = Pflanzen sehr stark befallen, überwiegender Teil der Blätter stark befallen oder abgestorben; 5 = Pflanzen total befallen, die meisten Blätter abgestorben.
Die Einzelbonitierungen wurden ermittelt und die Befallswerte errechnet (Tab. 8).

Ferbam hatte eine deutlich bessere fungizide Wirkung als alle anderen angewandten Mittel. Aber auch Vitigran 1 %, Collavin 1 %, Dithane-M 0,3 % und Pomarsol 0,2 % kann man als gut bezeichnen. Nur diese Mittel sind in den wirksamen Konzentrationen für den Freilandbekämpfungsversuch verwendet worden.

3. Freilandversuche

Mit den im Plattentest und im Gewächshaus vorgeprüften Fungiziden Vitigran, Collavin, Ferbam, Dithane-M und Pomarsol wurden Bekämpfungsversuche an zwei Standorten durchgeführt.

a) Im Niedermoorgebiet Ljubljansko Barje (Gemarkung Podpeč);
b) auf dem Versuchsfeld des Instituts für Pflanzenschutz der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim.

Versuchsglieder: 1 = Parzelle unbehandelt (kranke Kontrolle); 2 = Parzelle unbehandelt (gesunde Kontrolle); 3 = Parzelle behandelt mit Vitigran 1 %; 4 = Parzelle behandelt mit Collavin 1 %; 5 = Parzelle behandelt mit Dithane-M 0,3 %; 6 = Parzelle behandelt mit Ferbam 0,2 %; 7 = Parzelle behandelt mit Pomarsol 0,2 %.

a) Feldversuch in Podpeč

In einem gleichmäßig von Pfefferminzanthraknose befallenen Bestand (2. Anbaujahr) wurde ein Versuch nach obiger Anordnung angelegt. Für das Versuchsglied 2 wurde gesundes Pflanzgut aus einem anderen Anbaugebiet herangeholt. Die Parzellengröße betrug 2 × 1,5 m, von jedem Versuchsglied wurden vier Wiederholungen angebaut. Als Pflanzgut diente *Mentha pip.* L. Mitcham, jeweils 20 Pflanzen je Parzelle. Die Behandlungen erfolgten in zweiwöchigen Abständen am 6. Juni, 20. Juni und 4. Juli mit einer Aufwandmenge von 800 l/ha. Die Ernte wurde am 18. August 1959 vorgenommen.

Die Bonitierungen sind in Tabelle 9 und die Ertragsergebnisse in Tabelle 10 zusammengestellt.

Die stärksten Ertragsverluste zeigten sich in den kranken Kontrollen, und zwar bei allen ermittelten Ertragszahlen. Sie sind besonders auffällig bei den Blatt-Trockengewichten, die auf einen Relativwert von 64,5 zurückgingen. Nach Vitigran- und Ferbambehandlungen erreichten die Erträge etwa die Werte der gesunden Kontrollen. An dritter Stelle liegt Collavin mit ebenfalls noch guter Wirkung. Dithane-M und Pomarsol wirkten unbefriedigend.

b) Feldversuch in Hohenheim

Versuchsparzellen von 4,5 × 2 m wurden mit jeweils 60 Pfefferminzpflanzen (*Mentha piperita* L. Mitcham) am 27. April 1959 bepflanzt. Am 22. Juni und am 27. Juni wurden die Pflanzen bis auf die gesunden Kontrollen mit einer Sporensuspension des Pilzes *Sphaceloma menthae* Jenkins, Stamm L, infiziert und zur Wahrung der für eine Infektion notwendigen Luftfeuchtigkeit für die Dauer von sechs Tagen mit einer Folie überspannt. Die Behandlungen wurden am 4. Juli und 14. Juli durchgeführt. Am 27. Juli wurde der Versuch bonitiert (Tab. 9) und abgeerntet. Zur Trocknung der Pflanzen stand nur eine begrenzte

Zahl von Trocknungsdarren zur Verfügung, so daß zur gleichmäßigen Auswertung des Versuches je Parzelle nur 20 Pflanzen geerntet, getrocknet und ausgewertet werden konnten (jede dritte Pflanze aus jeder Parzelle). Die Ertragsergebnisse gibt Tabelle 10 wieder. Die Stoppeln wurden wiederum im Abstand von zehn Tagen mit denselben Fungiziden bei gleicher Aufwandmenge (800 l/ha) zweimal besprüht (3. August und 13. August) und am 16. September 1959 zum zweitenmal bonitiert und je Parzelle 20 Pflanzen abgeerntet. Der Versuch wurde in vier Wiederholungen durchgeführt. Die Bonitierungen sind in Tabelle 9 und die Ertragsergebnisse in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 9

Ergebnisse der Bonitierungen auf *Sphaceloma menthae*-Befall in Feldversuchen

Mittel	Konzentration %	Einzelbonitierungen der Pflanzen						Befallsgrad	
		0	1	2	3	4	5	P	Rel.
Versuch Podpeč									
1. Kranke Kontrolle	—	0	0	8	28	44	0	3,5	100,0
2. Gesunde Kontrolle		60	12	8	0	0	0	0,4	11,4
3. Vitigran	1,0	0	8	64	8	0	0	2,0	57,1
4. Collavin	1,0	0	8	56	16	0	0	2,1	60,0
5. Dithane-M	0,3	0	0	56	24	0	0	2,3	65,7
6. Ferbam	0,2	0	52	20	8	0	0	1,4	40,0
7. Pomarsol	0,2	0	12	20	48	0	0	2,5	71,4
Versuch Hohenheim, erster Schnitt									
1. Kranke Kontrolle	—	0	0	12	60	8	0	3,0	100,0
2. Gesunde Kontrolle	—	64	16	0	0	0	0	0,2	6,7
3. Vitigran	1,0	0	56	24	0	0	0	1,3	43,3
4. Collavin	1,0	8	44	20	8	0	0	1,4	46,7
5. Dithane-M	0,3	0	40	20	20	0	0	1,8	60,0
6. Ferbam	0,2	28	40	12	0	0	0	0,8	26,7
7. Pomarsol	0,2	0	16	44	20	0	0	2,1	70,0
Versuch Hohenheim, zweiter Schnitt									
1. Kranke Kontrolle	—	0	12	20	48	0	0	2,5	100,0
2. Gesunde Kontrolle	—	72	8	0	0	0	0	0,1	4,0
3. Vitigran	1,0	28	52	0	0	0	0	0,7	28,0
4. Collavin	1,0	24	44	12	0	0	0	0,9	36,0
5. Dithane-M	0,3	12	20	48	0	0	0	1,1	44,0
6. Ferbam	0,2	32	44	4	0	0	0	0,7	28,0
7. Pomarsol	0,2	12	32	36	0	0	0	1,3	52,0

P stellt das Mittel aus 80 Einzelbonitierungen je Versuchsglied (20 Pflanzen aus jeder Parzelle bei vier Wiederholungen) dar.

Bonitierungsschlüssel: 0 = kein Pilzbefall, 1 = Pflanzen stark befallen, 2 = Pflanzen stärker befallen, keine abgestorbenen Blätter, 3 = Pflanzen stark befallen, teilweise abgestorbene Blätter, 4 = Pflanzen sehr stark befallen, überwiegender Teil der Blätter stark befallen oder abgestorben, 5 = Pflanzen total befallen, die meisten Blätter abgestorben.

Tabelle 10

Einfluß verschiedener Fungizidbehandlungen auf den Ertrag von anthraknosekranker Pfefferminze

Relativzahlen: gesunde Kontrolle = 100; Absolutzahlen: Gewichtsangaben in g/20 Pflanzen

Art der Messung	Absolutzahlen in g		Relativzahlen				
	Kontrolle		Behandlungen				
	gesund	krank	Vit.	Coll.	Dith.-M	Fer.	Pom.
Versuch Podpeč, erster Schnitt							
Gesamtfrischgewicht	2893 = 100	67,9	95,1	84,5	79,4	97,9**	78,9
Gesamttrockengewicht	555,0 = 100	77,6	92,4*	80,2	79,1	95,1*	78,1
Blatttrockengewicht	259,9 = 100	64,5	81,1**	78,6	69,1	83,0**	69,7
Versuch Hohenheim, erster Schnitt							
Gesamtfrischgewicht	2943 = 100	68,9	94,5*	79,6	76,6	99,7**	77,5
Gesamttrockengewicht	650,8 = 100	62,1	87,7**	72,1	68,9	90,9**	65,1
Blatttrockengewicht	337,9 = 100	54,7	67,8*	65,6	59,1	70,1**	58,1
Versuch Hohenheim, zweiter Schnitt							
Gesamtfrischgewicht	2067 = 100	77,1	95,4*	94,9*	92,5	97,3**	80,5
Gesamttrockengewicht	537,9 = 100	64,6	93,6***	80,7**	79,8	97,3**	67,5
Blatttrockengewicht	234,5 = 100	67,8	90,0**	88,5**	74,8	91,3**	74,1

Relativzahlen sind bezogen auf gesunde Kontrolle. * = gesichert ($P < 5\,\%$); ** = gut gesichert ($P < 1\,\%$); *** = sehr gut gesichert ($P < 0{,}1\,\%$).

Wieder sind bei beiden Schnitten die kranken Kontrollen merklich geschädigt, und der starke Ertragsrückgang zeigt sich wieder beim Blatt-Trokkengewicht. Auch die bereits im Versuch Podpeč beobachtete Reihenfolge in der Wirksamkeit der Präparate bestätigt sich hier bei beiden Schnitten. Im einzelnen sind jedoch die Ertragswerte des zweiten Schnittes vorsichtiger zu interpretieren, da sie durch zusätzlichen Rostbefall beeinflußt wurden.

Die Befallsbonitierungen (Tab. 9) zeigen in beiden Feldversuchen die gleiche Tendenz, die auch bei Ertragsfeststellungen beobachtet wurde: starker Befall der kranken Kontrollen und abnehmende Wirksamkeit der Fungizide in der Reihenfolge Ferbam, Vitigran, Collavin, Dithane-M, Pomarsol. Bei allen Behandlungen blieb jedoch ein gewisser Befall bestehen. Eine Einschränkung der durch den Pilz verursachten Verluste an Blattmasse, die mit

ihrem Ölgehalt das Haupternteprodukt darstellt, ist das praktisch wichtigste Ergebnis der Bekämpfungsversuche. Die Feldversuche insgesamt bestätigten die bereits im Plattentest und in den Gewächshausversuchen gesammelten Erfahrungen.

4. Untersuchungen über Kupfer- und Eisenrückstände

Arzneipflanzen nehmen unter den landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturen eine besondere Stellung ein. So sind bei der Verwendung unverarbeiteter Planzen bzw. Pflanzenteile besondere Anforderungen auf Reinheit von Beimischung fremder Substanzen zu stellen. Bei der Pfefferminze werden die Blätter (Folia *Menthae pip.* — DAB 6) oder das aus den Blättern durch Destillation gewonnene ätherische Öl (Oleum *menthae pip.* — DAB 6) verwendet. Baines, Ellis und Swift (1942) berichten, daß durch Fungizidbehandlungen von Pflanzen weder die chemischen noch physikalischen Eigenschaften des ätherischen Öles beeinflußt werden. Doch bleibt die Frage offen, ob bei wirksamer Anwendung der Fungizide solche Rückstandsmengen auf Blättern verbleiben, daß sie den Verbraucher gefährden oder belästigen könnten. In den vorstehenden Freilandversuchen wurden mit Ferbam, Vitigran und Collavin die besten Ergebnisse zur Bekämpfung der Pfefferminzanthraknose erzielt. Die Bestimmung von Kupfer (Vitigran, Collavin) und Eisen (Ferbam) in behandelten, geernteten Blättern soll ein Beitrag zum Problem der an den Pflanzen verbleibenden Spritzmittelrückstände sein. Die untersuchten Blattproben wurden den oben besprochenen Feldversuchen entnommen.

Die Kupferbestimmungen (Tab. 11) ergeben für die ersten Schnitte relativ hohe Rückstände, dagegen für die zweiten sehr niedrige Werte. Die Diskrepanz ist durch starke Regenfälle zwischen der ersten und zweiten Ernte und durch wesentlich größere Zunahme der Blattmasse vor dem zweiten Schnitt zu erklären.

Die gleich nach der Behandlung ermittelte Eisenmenge von 195,0 mg in 1000 g Trockensubstanz würde umgerechnet in Ferbam 1440 mg ergeben. Diese Menge sinkt innerhalb von 10 Tagen auf 490 mg herab (Tab. 13). So stellt sie den maximalen Wert dar; der tatsächliche liegt wahrscheinlich wesentlich tiefer, weil nicht alles Eisen, welches bei der Analyse nachgewiesen wurde, als unverändertes Ferbam vorliegt. Auffallend ist, daß der Abfall der Eisenwerte zwischen der letzten Probenahme vor der ersten Ernte und der Probenahme vor der zweiten Ernte relativ sehr viel kleiner ist als der Abfall der Kupferwerte.

Kupferbestimmungen

Methodik

Jeweils 10 g bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Pfefferminzblätter wurden nach der Methode Ölschläger (1956) auf ihren Kupfergehalt untersucht. Die Untersuchungen erfolgten beim ersten Schnitt gleich nach der ersten Behandlung, zehn Tage später und bei der Ernte (13 Tage nach der zweiten Behandlung). Beim zweiten Schnitt erfolgten sie zur Zeit der Ernte (44 Tage nach der zweiten Behandlung). Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11

Kupferbestimmungen in Pfefferminzblättern

Probe	p. p. m. Kupfer in Trocken-substanz	p. p. m. Kupfer durch Behandlung
1. Vitigran		
Erster Schnitt		
Unbehandelte Kontrolle	16,2	—
Gleich nach der Behandlung	6344,6	6328,4
10 Tage nach der ersten Behandlung	1152,3	1136,1
13 Tage nach der zweiten Behandlung (Ernte)	3346,2	3330,0
Zweiter Schnitt		
Unbehandelte Kontrolle	17,4	—
44 Tage nach der zweiten Behandlung (Ernte)	43,5	26,1
2. Collavin		
Erster Schnitt		
Unbehandelte Kontrolle	16,2	—
Gleich nach der Behandlung	5604,9	5588,7
10 Tage nach der ersten Behandlung	2829,5	2813,3
13 Tage nach der zweiten Behandlung (Ernte)	3971,5	3955,3
Zweiter Schnitt		
Unbehandelte Kontrolle	17,4	—
44 Tage nach der zweiten Behandlung (Ernte)	30,4	13,0

Eisenbestimmungen

Methodik

Jeweils 10 g bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Pfefferminzblätter wurden nach der Methode BRETTHAUER (1956) auf Eisengehalt untersucht. Die Extinktion wurde im Stufenthermometer Elko II mit Farbfilter S 49 E/58 gemessen. An Modellversuchen wurde die Brauchbarkeit der Methode überprüft. Dazu wurde die Asche der Pfefferminzblätter mit 10%iger Salzsäure aufgenommen, steigende Mengen Eisenalaunlösung zugesetzt und das Eisen bestimmt (Tab. 12). Die Proben wurden zu den gleichen Terminen wie bei der Kupferbestimmung entnommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

Tabelle 12

Eisenbestimmungen nach BRETTHAUER (Modellversuch)

	Fe in den Blättern mg/10 g Trocken-substanz	Zugesetztes Eisenalaun mg/10 g	Gesamt-Fe mg/10 g	Gefunden Fe mg/10 g	Differenz mg/10 g
Trockene Blätter	2,3	1,0	3,3	3,30	0,0
	2,3	2,0	4,3	4,25	—0,05
	2,3	3,0	5,3	5,25	—0,05

Tabelle 13

Eisenbestimmungen in Pfefferminzblättern

Probe	p. p. m. Eisen in Trocken-substanz	p. p. m. Eisen durch Behandlung
Ferbam		
Erster Schnitt		
Unbehandelte Kontrolle	230,0	—
Gleich nach der Behandlung	425,0	195,0
10 Tage nach der ersten Behandlung	297,0	67,0
13 Tage nach der zweiten Behandlung (Ernte)	340,0	110,0
Zweiter Schnitt		
Unbehandelte Kontrolle	308,0	—
44 Tage nach der zweiten Behandlung (Ernte)	363,0	55,0

Veröffentlichungen über Untersuchungen von Fungizidrückständen auf Arzneipflanzen, wie sie für andere Nutzpflanzen in Vielzahl vorliegen, sind nicht bekannt geworden. Für Kupferverbindungen ist in den USA kein Toleranzwert festgelegt worden, für Ferbam sind allgemein 7 p. p. m. angegeben. Wenn die bei meinen Untersuchungen gefundenen Ferbamrückstände auch wesentlich über der amerikanischen Toleranz liegen, so ist zu berücksichtigen, daß die üblichen Toleranzwerte auf Erntegut und nicht auf Trockensubstanz berechnet werden, ferner der menschliche Verbrauch an Pfefferminze mengenmäßig wesentlich geringer ist als z. B. bei Obst und Gemüse.

5. Pfefferminzölgehalt *Sphaceloma*-befallener Pflanzen in Abhängigkeit von chemischen Behandlungsmitteln

Es interessierte, festzustellen, in welchem Ausmaß der Pilz *Sphaceloma menthae* die Öldrüsen beschädigt und den Ölgehalt verringern kann. Das geschieht auf zwei Wegen: erstens wird bei einem *Sphaceloma*-Befall die Blattmasse verringert, zweitens erzeugt das vom Pilz zerstörte Blattgewebe weniger ätherisches Öl.

Das deutsche Arzneibuch (DAB 6) schreibt einen Mindestgehalt von 0,7 % ätherischen Öles in den getrockneten Laubblättern von Pfefferminze vor, der wohl immer erreicht, oft aber um ein Vielfaches überschritten wird. Während nach der Vorschrift des DAB das ätherische Öl in Drogen nach dem Abdestillieren mit Wasserdampf und nachfolgender Extraktion mit Pentan gewichtsmäßig bestimmt werden kann, erfolgt nach zur Zeit gebräuchlichen Methoden die Bestimmung auf volumetrischem Wege mit anschließender Umrechnung auf Gewichtsprozente. Eine für diese Methode notwendige Apparatur hat bereits Clevenger (Petričić 1956) entwickelt. Durch diese war eine Destillation in einem geschlossenen System mit Hilfe einer Rücklaufvorrichtung ermöglicht. Für eigene Versuche ist die nach gleichem Prinzip arbeitende Destillationsapparatur von Cocking und Middleton benutzt worden (Petričić 1956).

Für die Auswertung konnte die erste Ernte des Hohenheimer Versuchs verwendet werden. Der zweite Schnitt war infolge zusätzlicher Infektion mit Pfefferminzrost (*Puccinia menthae* Pers.) für Ölbestimmungen nicht geeignet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 enthalten. Danach zeigt sich ein erheblicher

Unterschied im Ölgehalt zwischen den ausgelesenen gesunden und befallenen Blättern. Gegenüber der infizierten und unbehandelten Kontrolle zeigt sich ein deutlicher Effekt durch die Behandlung.

Tabelle 14

Ölgehalt der Pfefferminzblätter verschiedener Versuchsglieder in Prozent

(Mittel aus drei Wiederholungen)

Präparat	Ölgehalt in % $\bar{x}$	$s\bar{x}$
Kontrolle gesund	2,24	± 0,05
Kontrolle infiziert	1,87	± 0,05
Vitigran	2,07	± 0,05
Collavin	2,07	± 0,07
Ferbam	2,21	± 0,05
Dithane-M	2,04	± 0,02
Pomarsol	2,01	± 0,02
Gesunde Blätter[1])	2,32	± 0,02
Befallene Blätter[2])	1,17	± 0,09

[1]) Völlig gesunde Blätter von der nicht infizierten Kontrolle.

[2]) Blätter der infizierten unbehandelten Kontrolle mit starkem *Sphaceloma*-Befall (mindestens ein Drittel der Blattfläche befallen).

Zusammenfassung

1. Es wird über Auftreten und Verbreitung der Pfefferminzanthraknose berichtet. Erreger ist *Sphaceloma menthae* Jenkins, *Fungi Imperfecti, Melanconiales, Melanconiaceae*. Eine Literaturübersicht über die bisher beschriebenen *Spaceloma*-Arten zeigt die Verbreitung der von Pilzen dieser Gattung hervorgerufenen Anthraknoseerkrankungen. Über *Sphaceloma menthae* ist bisher nur aus dem USA-Staate Indiana berichtet worden. Im Jahre 1956 wurde sie in Jugoslawien beobachtet. Die Krankheit ist nur auf Moorböden bekannt, und es mögen klimatische und edaphische Faktoren sein, welche dort ihr Auftreten begünstigen.

2. Das Krankheitsbild stimmt mit dem in Amerika als „leopard spot" benannten überein. Die Symptome treten auf allen oberirdischen Pflanzenteilen, am stärksten an Blättern und Stengeln auf. Durch den Blattbefall werden die Öldrüsen zerstört, wodurch der Ölgehalt der angegriffenen Blätter wesentlich herabgesetzt wird.

3. An der Pflanze erfolgt die Vermehrung des Pilzes durch Konidien, die sich an der Oberfläche der nekrotischen Gewebe in Acervuli bilden. Eine geschlechtliche Fruchtform konnte nicht gefunden werden.

4. In der Kultur entstehen Konidien auf kurzen Konidienträgern direkt an den Hyphen. Die Chlamydosporenbildung ist in vitro eine sehr häufige Erscheinung.

5. Mit dem Stamm L (Ljubljana) von Ljubljansko Barje und mit dem Stamm 487, bezogen vom Zentraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland wurden vergleichende morphologische und physiologische Untersuchungen durchgeführt. Form und Größe der Konidien beider Stämme war nicht unterschiedlich, doch neigt Stamm L viel mehr zur Chlamydosporenbildung. Deutliche Unterschiede treten bei der Kultivierung auf verschiedenen Nährsubstraten in Form und Färbung der Kolonien, in der Intensität der Konidien- und Chlamydosporenbildung, in der Konidienkeimung, wie auch in der Verwertung verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen auf. Dadurch erwies sich der Stamm L als eine vom Stamm 487 verschiedene morphologisch-physiologische Rasse.

6. Inkubationsversuche zeigten, daß eine 48 Stunden andauernde Sättigung der Atmosphäre und eine Temperatur über 16 °C für Infektionen notwendig sind. Bei etwa 80%iger rel. Feuchtigkeit gelangen die Infektionen nicht. Bei 20 °C ist die Inkubationszeit 8 bis 10 Tage, bei 16 °C 14 Tage. Niedere Temperaturen verlängern die Inkubationszeit.

7. Durch Infektionsversuche an vierzehn *Mentha*-Arten wurde die Pathogenität beider Stämme für alle getesteten *Mentha*-Arten nachgewiesen.

8. Der Pilz überwintert im befallenen Gewebe der oberirdischen Ausläufer als Myzel. Es gelang, ihn im Frühjahr von der Randzone der vorjährigen Nekrosen aus dem Gewebe zu isolieren. Isolationsversuche aus den abgestorbenen Stoppeln verliefen negativ.

9. Die Krankheit ist mit infiziertem Pflanzengut übertragbar. Ebenso ist eine Übertragung durch infizierte Ackerminze möglich.

10. Zur chemischen Bekämpfung der Pfefferminzanthraknose wurden Fungizide in Labor- und Gewächshausvorversuchen geprüft. Die wirksamsten Mittel Kupferoxychlorid-Vitigran 1 %; Kupferoxydul-Collavin 1 %; Manganaethylen- bis -dithiocarbamat — Dithane-M 0,3 %; Eisendimethyldithiocarbamat — Ferbam 0,2 % und Tetra-Methyl-Thiuram-Disulfid — Pomarsol 0,2 % wurden in Freilandversuchen angewandt. In allen diesen Versuchen war die Wirkung von Ferbam und Vitigran recht gut. Eine vollständige Unterdrückung der Krankheit konnte jedoch nicht erzielt werden.

11. Untersuchungen auf chemische Spritzmittelrückstände an Pfefferminzblättern sind auf Vitigran, Collavin und Ferbam durchgeführt worden. Bei dem ersten Schnitt wurden beträchtliche Mengen an Rückständen nachgewiesen. Für den zweiten Schnitt ergaben sich wesentlich geringere Werte. Diese Diskrepanz ist durch starke Regenfälle zwischen der ersten und der zweiten Ernte und durch wesentlich größere Zunahme der Blattmasse nach der letzten Behandlung vor dem zweiten Schnitt zu erklären.

12. Blätter aus gesunden und infizierten Parzellen wurden auf ihren Gehalt an ätherischem Öl analysiert. Durch starken Befall (etwa ein Drittel jedes Blattes) sank der Ölgehalt auf die Hälfte des normalen Gehaltes. Durch die Behandlung konnte der Ölgehalt gehoben werden.

Summary

1. On the occurence and dissemination of the peppermintanthracnose is reported. The causal organism is *Sphaceloma menthae* Jenkins, *Fungi Imperfecti, Melanconiales, Melanconiaceae.* A review of the literature of the *Sphaceloma* species described as yet is mentioned. As yet on *Sphaceloma menthae* has been reported only from USA. It was observed in Yugoslavia in the year 1956. The disease is known only on marshylands and probably it might be the climatic and edaphic factors which favour its' occurence there.

2. The symptoms appear on all aerial parts of the plant, intensively on foliage and stem. Through the attack on leaves the oilglands are destroyed, due to which the oil content of affected leaves is significantly reduced.

3. The dispersal of the fungus on the plant takes place by means of conidia, which are formed in the acervuli on the necrotic tissues.

4. In the cultures, the conidia appear directly on the hyphae on small conidiophores. The chlamydospores formation is a very common appearence in vitro.

5. Comperative morphological and physiological observations were made with the strain L (Ljubljana) from Ljubljansko Barje and with the strain 487 procured from Zentraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland. No difference was observed in form and size of conidia from the two strains. It can be easily observed that the strain L shows more chlamydospore formation. By cultivation on different nutrient-media significant differences were found in the form and colouring of the colonies, in the intensity of the conidia and chlamydospores formation, in the germination of conidia as well as in the utilization of some carbohydrate and nitrogenous sources. It can be concluded that the strains L and 487 are two different morphologico-physiological races.

6. Incubation experiments showed that a saturation of atmosphere up to 48 hours and a temperature above 15 °C was necessary for infection. By about 80 % relative humidity the infection did not occur. At 20 °C the incubation period is 8 to 10 days and at 16 °C 14 days. Lower temperatures prolong the time of incubation.

7. Through the infection tests conducted on 14 *Mentha* species the pathogenicity of both strains for all tested *Mentha* species was proved.

8. The fungus hibernates as mycelium in the fallen tissues of the aerial stolons. It can be successfully isolated in the spring from the peripheral zones of necrotic tissues of last year. Isolation experiments from the dead stubbles turned out negative.

9. The disease is carried over by the infected plantmaterial. Similarly the carrying over through the infected *Mentha arvensis* L. is possible.

10. For the chemical control of peppermint anthracnose the fungicides were tried through preliminary trials in laboratory as well as in glasshouse.

The more effective means which were used in field trials were: copperoxychlorid — Vitigran 1 %; copperoxydul — Collavin 1 %; manganaethylen-bis-dithiocarbamate — Dithane-M 0.3 %; irondimethyldithiocarbamate — Ferbam 0.2 % and tetra-methyl-thiuram-disulfid — Pomarsol 0.2 %. Ferbam and Vitigran gave the most effective results during these trials. However a complete suppression of the disease could not be achieved.

11. The observations on the remains of chemical spray materials on peppermint foliage for Vitigran, Collavin and Ferbam were carried out. Considerable quantities of remains were proved by the first harvest. Significantly lower values were obtained by the second harvest. This dicrepancy is accounted for by the strong rains during the first and the second harvest and due to the significantly larger increase in the foliage material, after the last treatment befor the second harvest.

12. The leaves from healthy and infected plots were analysed for their ether-oil content. By the strong infections (about 1/3 each leaf) the oil content was reduced to half of normal content. Through the treatment the oil content could be re-gained.

Literaturverzeichnis

1. Andrade, A. C., 1958: Aspectos do emprego dos fongicidas em 1957. Biologico **24**, 55—63.
2. Anonym, 1948: Plant diseases. Notes contributed by the biological Branch. Agric. Gaz. N. S. W. J. **59**, 527—530.
3. — —, 1954: Mint Farming. Fmrs.' Bull. U. S. Dep. Agric. No. 1988.
4. — —, 1959: Pflanzenschutzmittel-Verzeichnis. Biol. Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig.
5. Arnaud, G., and A. A. Bitancourt, 1949: The perfect stage of the fungus causing spot anthracnose of *Arbutus unedo* L. Mycologia **41**, 320—322.
6. Baines, R. C., 1938: Mint anthracnose. Phytopathology **28**, 103—113.
7. — —, N. K. Ellis and L. J. Swift, 1942: Fifty-fifth Ann. Rep. of Purdue Univ. Agric. Exp. Sta. Lafayette, Indiana.
8. Barrus, M. F., and J. G. Horsfall, 1928: Preliminary note on Snowberry anthracnose. Phytopathology **18**, 797—801.
9. Bary, A. de, 1873: Über sogenannten Brenner (Pech der Reben). Ann. Oenol. **4**, 165—167.
10. Biesalski, E., 1957: Pflanzenfarben-Atlas mit Farbzeichen nach DIN 6164. Musterschmidt-Verlag, Göttingen, Berlin, Frankfurt.
11. Bitancourt, A. A., 1937: Novas species de *Sphaceloma* sobre *Terminalia* e *Genipa*. Arch. Inst. biol. **8**, 197—200.
12. — —, 1945: Novas expécies sul-americanas do género *Elsinoë*. Arch. Inst. biol. **16**, 19—25.
13. — —, and A. E. Jenkins, 1936: Perfect stage of the Sweet Orange fruit scab fungus. Mycologia **23**, 489—492.

14. BITANCOURT, A. A., and A. E. JENKINS, 1940: New discoveries of Myriangiales in the Americas. Proc. eigth Amer. sci. Congr. Biol. Sci. Bot., 151—172.

15. — —, e — —, 1940: Novas species de *Elsinoë* e *Sphaceloma* sobre hospedes de importancia economica. Arch. Inst. biol. **11**, 45—58.

16. — —, and — —, 1943: *Elsinoë viticola*. Mycologia **35**, 510—516.

17. — —, e — —, 1946: A verrugose da mangueira. Arch. Inst. biol. **17**, 205—228.

18. — —, e — —, 1949: Estudos sobre as Miriangiales II. Dez novas species de Elsinoaceas descobertas do Brasil. Arch. Inst. biol. **19**, 93—109.

19. — —, e — —, 1950: Estudos sobre Miriangiales. II. Arch. Inst. biol. **20**.

20. — —, e — —, 1950/51: Estudos sobre as Miriangiales II. Vinte novas especies de Elsinoaceas neotropicais. Arch. Inst. biol. **20**, 1—28.

21. — —, e — —, 1956: Estudos sobre as Miriangiales VIII. Anthracnose maculada da Seringueira, causada par *Elsinoë*. Arch. Inst. biol. **23**, 41—66.

22. — —, e J. P. NETO DA C., 1950/51: Elsinoaceas do Rio Grande do Sul, Brasil. Arch. Inst. biol. **20**, 29—34.

23. BRETTHAUER, G., 1956: Über den Eisengehalt der Süßmoste. Die Fruchtsaftindustrie **1**, 184—190.

24. CHEO, C. C., and A. E. JENKINS, 1945: *Elsinoë* and *Sphaceloma* diseases in Yunnan. China, particulary Hyacinth Bean scab and scab of Castor Bean. Phytopathology **35**, 339—352.

25.* CICCARONE, A., 1959: Nuovi parassiti dell'olivo e del Mandorlo. Ital. agric. **96**, 202—204.

26.* COOMBE, B. G., 1954: Control of black spot of Sultanas. J. Dep. Agric. S. Austr. **58**, 29—31.

27.* COSTA, A. S., 1950: Emprego de carborundo em inoculacoes com *Sphaceloma*. Bragantia **10**, 35—36.

28.* DIFFLOTH, P., 1923: Les ennemies de la vigne. Galles et cryptogames. La Vie agric. **22**, 367—370.

29. FAWCETT, H. S., 1916: *Citrus* scab. Phytopathology **6**, 442—445.

30.* FERREIRA, A. H., 1958: Considerandos sobre as tratmentos fitossanitarios dos Citrinos. Gaz. agric. Mocamb. **10**, 40—43.

31.* GAUDINEAU, M., 1954: Maladies cryptogamiques de la vigne. Conferenze held on 4th Febr. 1954. Agric. Res. of the South-West, 5 pp.

32.* HANSFORD,. C. G., 1932—34: Annual Report of the Mycologist, 1932. Ann. Rept. Dept. of Agric. Uganda, for the year ended 31st Dec., 1932 (Part II), 55—56, 1933, 48—51.

33. JANKE, A., 1946: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie I. Theodor Steinkopf Verlag, Dresden und Leipzig, S. 108.

34. JENKINS, A. E., 1925: The *Citrus* scab fungus. Phytopathology **15**, 99—104.

35.* — —, 1931: Development of the *Citrus*-scab organism, *Sphaceloma fawcettii*. J. agric. Res. **42**, 545—558.

36. — —, 1932: Rose anthracnose caused by *Sphaceloma*. J. agric. Res. **45**, 321—337.

37.* — —, 1932: *Elsinoë* on apple and pear. J. agric. Res. **44**, 689—700.

38. — —, 1934: A species of *Sphaceloma* on Avocado. Phytopathology **24**, 84—85.

39. — —, 1936: Australian *Citrus* scab caused by *Sphaceloma fawcettii scabiosa*. Phytopathology **26**, 195—197.

40.* Jenkins, A. E., 1937: New species of *Sphaceloma* on *Aralia* and *Mentha*. J. Wash. Acad. Sci. **27**, 412—414.

41. — —, 1942: *Poinsettia*-scab caused by *Sphaceloma*. Phytopathology **32**, 336—337.

42.* — —, 1946: *Elsinoë piri* in France and Spain in the light of quarantine interceptions. Mycologia **38**, 450—452.

43.* — —, 1947: A new species of *Elsinoë* on Capulin Sherry. J. Wash. Acad. Sci. **37**, 86—89.

44. — —, e A. A. Bitancourt, 1939: Illustracoes das doencas causadas por *Elsinoë* e *Sphaceloma* conheidias na America do Sul atè Janeiro do 1036. Arch. Inst. biol. **10**, 31—61.

45. — —, e — —, 1946: Observacoes sobre especies do genero *Elsinoë* da Uganda. Arch. Inst. biol. **17**, 47—54.

46. — —, e — —, 1947: Duas verrugosas do Chá, causadas por *Elsinoë*, e sua destribuicao. Arch. Inst. biol. **17**, 67—72.

47.* — —, e — —, 1955: Notas sôbre as antracnoses maculadas e assuntos correlatos. VII. Novas especimens do Brasil meridional. Biologico **21**, 204—210.

48.* — —, e — —, 1955: Notas sobre as antracnoses maculadas e assuntos correlatos. VIII. Espécimens escolhidos de *Elsinoë* e *Sphaceloma*. Biologico **21**, 217—221.

49. — —, — — e G. Goidanich, 1956: Estudos sôbre as Miriangiales IX. *Elsinoë* sôbre calvalho (*Quercus* sp.). Arch. Inst. biol. **23**, 117—123.

50.* — —, — — and F. G. Pollack, 1946: Spot anthracnoses in the United States. J. Wash. Acad. Sci. **36**, 416—421.

51.* — —, and L. Grodsinsky, 1943: *Sphaceloma* on Willow in New Zealand. Trans. Brit. mycol. Soc. **26**, 1—3.

52.* — —, and J. H. Miller, 1952: A new species of *Sphaceloma* on *Magnolia*. J. Wash. Acad. Sci. **42**, 323—325.

53. — —, and C. L. Shear, 1946: *Gloeosporium venetum* and *G. necator*: Two distinct species on *Rubus*. Phytopathology **36**, 1043—1048.

54.* — —, and H. G. Ukkelberg, 1936: Scab of goldenrod caused by *Elsinoë*. J. agric. Res. **51**, 515—525.

55.* — —, and A. P. Viegas, 1943: Stem and foliage scab of Sweet Potato (*Ipomea batatas*). J. Wash. Acad. Sci. **33**, 244—249.

56.* Kurata, H., and K. Kuribayaski, 1954: Soy Bean scab caused by *Sphaceloma glicines*. Ann. phytopath. Soc. Japan **18**, 119—121.

57.* Kurosawa, E., and S. Katsuki, 1956: Miscellaneous notes on Myriangiales from Japan. II. Bot. Mag. Tokyo **69**, 817, 315—318.

58.* Limber, D. P., F. G. Pollack and A. E. Jenkins, 1946: *Elsinoë* discovered on *Sesbania* and *Cinnamomum* in the United States. Mycologia **38**, 463—472.

59.* Martin, G. W., 1940: Outline of fungi. Stud. nat. Hist. Ia Univ. **18**, 1—40.

60. Massey, L. M., R. P. White and A. E. Jenkins, 1933: Disease of cultivated sweet Violet caused by *Sphaceloma*. Phytopathology **23**, 22—23.

61. Mijušović, M., 1956: Prilog poznavanju parazitne flore u NR Crnoj Gori. Zasht. Bilja **34**, 73—78.

62.* Miller, J. H., and A. E. Jenkins, 1955: A new species of *Elsinoë* on southern *Magnolia*. Mycologia **47**, 104—108.

63. Mudra, A., 1958: Statistische Methoden für Landwirtschaftliche Versuche. Verlag Paul Parey.

64.* Muller, A. S., A. E. Jenkins and A. A. Bitancourt, 1954: *Elsinoë* and *Sphaceloma* in Florida. Plant Dis. Reptr. **38**, 599—601.

65. Oelschläger, W., 1956: Bestimmungen von Mineralstoffen bzw. Spurenelementen in biologischen Substanzen. Verlag Friedrich Find, Stuttgart-Plieningen.

66. Petričič, J., 1956: O kontroli droga s eterskim uljem. Farm. glasn. **12**, 504—508.

67. Ruge, U., 1951: Übungen zur Wachstums- und Entwicklungsphysiologie der Pflanze. Springer Verlag, S. 136.

68. Schneider, R., 1958: Untersuchungen über Variabilität und Taxonomie von *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. Phytopath. Z. **32**, 95—148.

69. Schropp, W., 1950: Der Vegetationsversuch. 1. Die Methodik der Wasserkultur höherer Pflanzen. Methodenbuch Band VIII, Neumann Verlag, Rudelbeul und Berlin, S. 134.

70. Schweizer, H., 1958: Beiträge zur Biologie des Kirschen- und des Pfirsichschorferregers (*Fusicladium cerasi* [Rabh.] Sacc., *Venturia cerasi* Ad. und *Cladosporium carpophilum* v. Thüm.). Phytopath. Z. **33**, 55—98.

71. Shear, C. L., 1929: The life history of *Sphaceloma ampelinum* de Bary. Phytopathology **19**, 673—679.

72. Skinner, F. A., 1956: Inhibition of the growth of fungi by *Streptomyces* spp. in relation to nutrient conditions. J. gen. Microbiol. **14**, 381—392.

73.* Taylor, R. H., 1954: Black spot of the Vine-new recommendations of control. J. Dep. Agric. Vict. **8**, 370—374.

74. Thirumalachar, M. J., 1946: Diseases caused by fungi of the genera *Elsinoë* and *Sphaceloma* in Mysore (South India). Arch. Inst. biol. **27**, 55—66.

75. Valenčič, D., i V. Dermelj, 1956: Pokusno gajenje *Menthae pip.* L. na Ljubljanskom Barju. Nur im Manuskript vorliegend.

76.* Wade, G. C., 1956: Rose diseases in Tasmania. Tasm. J. Agric. **26**, 135—141.

77.* Walker, E. A., C. T. Rogerson and A. E. Jenkins, 1952: Additional collections of Plantain scab and violet scab from several North Central States. Plant. Dis. Reptr. **36**, 331—332.

78.* Wallace, G. B., and M. M. Wallace, 1954: Tanganyika fungus list: Recent records Nos. XVI, XVII, and XVIII. Mycol. Circ. Dep. Agric. Tanganyika **33**, 6, **34**, 8, 1953; **36**, 7.

79. — —, A. E. Jenkins e A. A. Bitancourt, 1955: Estudos sôbre as Miriangiales, VI. Verrugose do Mamoeiro, causada por *Sphaceloma*. Arch. Inst. biol. **22**, 79—86.

80. Westcott, C., 1950: Plant disease Handbook. Verlag D. Van Nostrand Company, Inc. 57.

* Die Arbeit war nur im Referat zugänglich.

From the Rubber Research Institute of Ceylon
Dartonfield, Agalawatta
Director: Dr. E. D. C. Baptiste

On *Fomes lignosus* (Klotzsch) Bres. the causative agent of the White Root disease of the Para rubber tree, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

By

A. Riggenbach

With one figure

Contents: Introduction. — Material and Methods. — General Growth Requirements. — Nitrogen Assimilation. — Decomposition of Organic Materials. — Summary. — Acknowledgements. — Zusammenfassung. — Literature cited.

INTRODUCTION

The White Root disease of the Para rubber tree, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. caused by the fungus *Fomes lignosus* (Klotzsch) Bres. is of widespread occurrence in Ceylon, Malaya, Indonesia (van Heli 1949), the Belgian Congo (Pichel 1956), the Amazon Valley (Weir 1926) and other tropical countries.

The disease is of considerable economic importance as it may cause the death of young rubber plants, usually during the first four years of life in replanted areas. The incidence of White Root disease during this stage of growth may be high and 20 per cent of all smallholders' replantings in Ceylon may be infected (Wijewantha 1960). In individual clearings the incidence of the disease may vary from a few trees to about 25 per cent of the stand.

Fomes lignosus has also been found on other cultivated tropical plants of economic importance such as cocoa, coffee, tea, coconut, oil palm, various species of fig, jak, mango, bamboo, manioc, camphor, and also on numerous leguminous and other plants used as ground cover or for shade, such as *Erythrina, Albizzia, Leucaena glauca, Tephrosia candida* and *Crotalaria* (Roger 1951).

In Ceylon the incidence of the disease in rubber plantings is higher in regions with high annual rainfall and is especially severe on swampy "deniya" lands or in rubber replantings with a previous history of root

disease. It occurs also in areas formerly under tea, *Thea sinensis* (PETCH 1921). The White Root disease has, so far, been studied under field conditions, mainly in regard to its distribution and spread. Agronomical measures based on these studies have been developed for the control of the disease by the prevention of its spread from diseased to healthy trees. In this connexion mention may be made of the studies of PETSH (1921), SHARPLES (1936), NAPPER (1932 a, 1932 b, 1933, 1934, 1937, 1938 a, 1938 b, 1939, 1940, 1941), MURRAY (1938, 1939, 1940) and the comprehensive publications of GARRETT (1944, 1956).

Fomes lignosus has been little studied in pure culture and few reports on such work are found in the literature (BRYCE 1922, PETCH 1928, BOSE and BAKSHI 1957). The present work may contribute some new observations on this fungus.

MATERIAL AND METHODS

1. The fungus

It is generally agreed that many specific properties of fungi vary considerably within the same species and that different strains may show quite different behaviour and reactions (GÄUMANN 1951, FOSTER 1949). In order, therefore, to obtain reliable results, great care was taken to base the *in vitro* experiments described in this paper not only on one strain of *Fomes lignosus* but on a number of different strains of various origin. The strains used, their origin and their host plants are listed in the following table:

Table 1

The origin of the different strains of *Fomes lignosus* (Klotzsch) Bres. used in this investigation

Strains	Origin	Host plant
Fomes lignosus RRIC 10	Ceylon (Dartonfield)	*Hevea brasiliensis*
Fomes lignosus RRIC 28	Malaya (RRIM 9)	*Hevea brasiliensis* (young plant)
Fomes lignosus RRIC 29	Malaya (RRIM 22)	*Pueraria phaseoloides*
Fomes lignosus RRIC 30	Malaya (RRIM 24)	*Crotalaria anagyroides*
Fomes lignosus RRIC 31	Malaya (RRIM 27)	*Hevea brasiliensis* (old rubber)
Fomes lignosus RRIC 32	Ceylon (Dartonfield)	*Hevea brasiliensis*
Fomes lignosus RRIC 44	Centraalbureau voor Schimmelcultures	*Hevea brasiliensis*

Strains RRIC 10 and RRIC 32 were isolated from fructifications of *Fomes lignosus* found on mature rubber trees on Dartonfield Estate of the RRI of Ceylon. Strains RRIC 28, RRIC 29, RRIC 30 and RRIC 31 were received from the Rubber Research Institute of Malaya (RRIM) and strain

RRIC 44, originally isolated by NAPPER in Malaya, was received from the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland.

2. Inoculum for Petri dish experiments

In the Petri dish experiments described in this paper, the dry inoculation method (FOSTER 1949) was used. The inoculum was incubated for 10 days on malt agar medium contained in Petri dishes.

3. Inoculum for Erlenmeyer flask experiments

The wet inoculation method was used in the Erlenmeyer flask experiments. The fungus was cultured for 28 days on rubber wood medium. Rubber wood cultures were prepared in 500 ml Erlenmeyer flasks, each flask containing 20 ml of water and 50 g. of small pieces (about 0.5 × 0.5 × 5 cm) of fresh rubber wood. The flasks were sterilized for 20 minutes at one atmosphere pressure.

To prepare the inoculum 100 ml of sterile distilled water were added to each wood culture flask, and the flasks were vigorously shaken to obtain a well dispersed mycelial suspension.

This mycelium suspension comprised the inoculum which was added at the rate of 0.5 ml to each flask containing the various media used in these experiments.

The wood cultures used for the preparation of the inoculum were found more suitable than those of malt agar or rice. This was especially important in the case of the vitamin experiments in order to prevent contamination by the inoculum substrate.

4. Chemicals

The chemicals used were of "Analar" grade or special "Biochemicals" (Hoffmann-La Roche).

5. Malt agar

The malt agar used for the Petri dish experiments consisted of:

Malt Extract ("Wander")	20 g/l
Agar	20 g/l
H_2O dist.	1000 ml.

6. Culture solution

As basic culture medium for most of the Erlenmeyer flask experiments a modified Knop solution (FREY-WYSSLING 1949, FLÜCK 1955) was used. This modified Knop solution with glucose contains:

$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$	1.0 g.
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0.25 g.
KH_2PO_4	0.25 g.
KCl	0.125 g.
$FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$	Trace
Glucose	10.0 g.
H_2O dist.	1000.0 ml.

All experiments on liquid culture solutions were carried out in 500 ml. "Jena" Erlenmeyer flasks, each flask containing 100 ml of liquid medium.

7. pH Measurements

Determination of pH values was carried out electrometrically with glass electrodes.

8. Sterilization

Culture media were sterilized for 20 min. at 1.0 ± 0.2 atm. in an automatic electric steam pressure autoclave.

9. Determination of mycelial dry weights

Mycelial dry weights were determined by the method described by STOLL (1954). The mycelium of each culture flask was filtered through a Buchner funnel, washed with 1000 ml of distilled water of 80 °C, dried overnight at 75 °C and then for 4 hours at 103 °C.

10. Replication of experiments

All experiments and tests were replicated at least twice.

GENERAL GROWTH REQUIREMENTS

1. The disease

In Ceylon the White Root disease causes the greatest damage to rubber plants between the second and fifth year of life. The number of trees dying as the result of attack by *Fomes lignosus* diminishes rapidly with age. Trees 30 to 40 years of age may harbour the disease on their roots without showing any aboveground symptoms and the writer has found quite a number of such cases on rubber plantations. RENNERFELT (1946, 1957) made similar observations in Sweden with the root rot of spruce (*Picea abies*) and of pine (*Pinus sylvestris*) caused by *Fomes annosus* Fr. He found that whereas 20 to 30 years old pines are easily killed by the disease, those of 50 and more years have, in general, greater resistance. Agronomical control methods used in Sweden are similar to those carried out on tropical rubber plantations for the control of the White Root disease.

Young rubber trees attacked by *Fomes lignosus* show after some time a typical yellowing and inward curling of the margins of the leaves of one or more of the leaf whorls. These visual symptoms appear when the fungus has reached the tap root of the tree, growing along one or more of the main lateral roots. The mycelium then grows around the collar of the tree, which is doomed unless suitable control measures are immediatly taken (RIGGENBACH 1958).

Young *Hevea* budded trees of most clones normally start flowering when they are about 5 to 7 years old. *Fomes*-infected trees may, however,

flower and fruit at an earlier age. Early flowering and fruiting of a tree is in many cases a sign of root infection or other debility.

The fungus forms thin mats or flat strands of mycelium, about one millimetre thick, on the roots of affected plants. These mats or strands, known as rhizomorphs, are white when young and turn yellowish to reddishbrown with age.

Rhizomorphs of *Fomes lignosus* on a piece of root of *Hevea brasiliensis* (about natural size)

2. Nomenclature

There exists some confusion regarding the nomenclature of *Fomes lignosus*. In the French literature the fungus is named *Leptoporus lignosus* (Klot.) Heim ex. Pat. (Roger 1951) whilst in the English literature, e. g. in the publications of the Rubber Research Institute of Malaya (Hilton 1959), the fungus is named *Fomes lignosus* (Klotzsch) Bres. In a recent Indian publication (Bose and Bakshi 1957) the fungus is called *Polyporus lignosus* (Klotzsch).

In this publication, which is not concerned with nomenclature, the fungus is referred to as *Fomes lignosus*.

3. Influence of temperature

The temperature requirements of *Fomes lignosus* have been determined on solid medium in Petri dish cultures and on liquid medium in Erlenmeyer flask cultures.

In the Petri dish experiments *Fomes lignosus* was grown on malt agar. The growth rate of *Fomes lignosus* at the various temperatures was determined by measuring the mean diameter of the colonies, 10 plates being incubated at each temperature. A typical result of one experiment is given in table 2.

Similar results were obtained when *Fomes lignosus* was grown on liquid Knop-glucose medium to which 10 g/l malt extract had been added.

The result of an experiment is given in table 3.

The optimum temperature for the growth of the different strains of *Fomes lignosus* lies between 27° and 30 °C. A part of the results of the temperature experiments can be seen from tables 2 and 3. It was of interest to compare this optimum temperature found in the laboratory with the actual outdoor temperatures. The monthly mean temperatures for 1956 of the main centres of the four principal rubbergrowing districts of Ceylon are given in table 4 (Dassanayake 1959).

The mean temperatures in all of these four stations within the planting districts vary little throughout the year. It may be assumed, therefore, that the temperature of the shaded top soil layer in a rubber plantation would

Table 2

Mean diameter of the colonies of *Fomes lignosus* in Petri dishes on malt agar after 6 days at various temperatures

Fomes lignosus strain	Diameter of colonies in mm after 6 days at							
	18 °C	21 °C	24 °C	27 °C	30 °C	33 °C	36 °C	39 °C
RRIC 10	15.2	32.5	44.4	63.8	67.4	47.2	14.4	0.0
RRIC 32	13.2	38.4	52.6	71.3	74.2	54.0	18.9	0.0

Table 3

Mycelium (dry weight in mg) and pH of *Fomes lignosus* strain RRIC 10 on Knop-glucose medium with 10 g/l malt extract after 28 days at various temperatures

Temperature in °C	pH values		Mycelium per flask (mean dry weight in mg.)
	initial	final	
18	5.6	4.8	37.2
21	5.6	4.8	196.6
24	5.6	4.7	248.4
27	5.6	4.7	276.5
30	5.6	4.9	278.7
33	5.6	4.8	173.1
36	5.6	4.8	30.9
39	5.6	5.2	2.0

be around the same mean of about 27 °C. When comparing the yearly average temperatures at these four stations with the optimum temperature for the growth of *Fomes lignosus* it is observed that they show excellent agreement.

4. Growth on liquid media

Having determined the optimum temperature, it was necessary for the purpose of subsequent studies to grow *Fomes lignosus* on liquid media. To find the best inorganic medium for combination with organic materials, *Fomes lignosus* was grown on the culture solutions according to Czapek, Fries I, Fries II, Fries III, Knop and Rauling. As *Fomes lignosus* failed to grow, even slightly, on any one of these culture solutions, a deficiency of the fungus in some vitamins or other essential growth factors was suspected. Knop, Fries I and Czapek media therefore were modified by adding to the pure basic salt solution 10 g/l glucose as carbon source and 10 g/l malt extract for providing the required growth-promoting substances. Fries II, Fries III, and Rauling media, which already contain organic salts, were

Table 4

Situation, Elevation, Rainfall and Temperature of the centres of the four main rubber-growing districts of Ceylon

Meteorological Station	Colombo	Galle	Kandy	Ratnapura
Situation	Western Province	Southern Province	Central Province	Sabaragamuwa Province
Elevation above sea level in m.	7	12	479	33
Annual Rainfall (average) in mm.	233.1	238.8	205.1	355.2
Temperature (average) for 1956				
January	26.2° C	25.8° C	23.1° C	26.8° C
February	26.4°	26.3°	23.8°	27.4°
March	27.2°	27.0°	25.3°	27.9°
April	27.7°	27.4°	26.0°	28.0°
May	27.9°	27.5°	25.7°	27.8°
June	27.4°	26.9°	24.7°	27.1°
July	27.1°	26.4°	24.1°	26.9°
August	27.2°	26.4°	24.4°	26.9°
September	27.2°	26.6°	23.8°	26.9°
October	26.6°	26.2°	24.8°	26.7°
November	26.2°	26.1°	24.0°	26.7°
December	26.2°	25.8°	23.2°	26.6°
Yearly average	26.6°	26.0°	24.1°	27.0°

Table 5

Mycelium (dry weight in mg) and pH of different strains of *Fomes lignosus* on different modified culture solutions after 28 days at 27 °C

Strain of *Fomes lignosus*	Mycelium per flask (dry weight in mg) and pH of culture medium at the end of the experiment on modified solution according to:					
	Knop		Fries I		Czapek	
	mg	pH	mg	pH	mg	pH
RRIC 10	389.0	4.6	160.6	4.0	236.7	5.8
RRIC 28	407.5	4.6	325.8	4.3	381.8	5.8
RRIC 29	376.1	4.5	239.9	4.4	372.8	6.0
RRIC 30	491.7	4.4	340.7	4.4	474.9	6.0
RRIC 31	428.6	4.5	200.8	4.6	301.0	6.1
RRIC 32	496.0	4.5	234.4	4.5	506.7	6.0
RRIC 44	300.5	4.5	163.4	4.2	277.3	5.7

not included because of possible interference of the organic salts in the experiments described in this paper.

As seen from table 5 the variation in growth on the three different media is not very large. Maximum growth was reached in about 28 days and the duration of the experiments was therefore limited to 28 days.

In subsequent experiments Knop solution was used exclusively as the basic medium.

Knop solution has also proved successful as a basic medium in other studies (BAZZIGHER 1953, FLÜCK 1955, KOHLMEYER 1956).

The fact that malt extract is required for the growth of *Fomes lignosus* indicates that the fungus requires for its growth a supply of some vitamins or other growth factors.

5. Growth on organic debris

When considering the ways and means by which the White Root disease spreads, it is important to know whether *Fomes lignosus*, which is normally found as a parasite on living material such as plant roots, could subsist on dead organic material or even on soil and thus behave as a facultative saprophyte (FISCHER and GÄUMANN 1929).

It is known from the literature (e. g. NAPPER 1934), and from own observations, that the disease mostly spreads underground from tree to tree although dissemination by air-borne spores may also be of importance (NEWSAM 1959, 1960, MEREDITH 1959). Examination of root systems of affected trees reveals that in many cases the infected roots of two neighbouring trees come into actual contact or that the fungus travels through the soil from infected trees by means of rhizomorphs. When growing through soil the rhizomorphs show preference for hard surfaces, e. g. rocks, hard soil formations. Invariably, when examining a newly infected tree in a replanted area and tracing back the rhizomorphs, the starting point of the fungus is found on an old infected piece of root or stump. It was, therefore, interesting to obtain more information about the ability of *Fomes lignosus* to utilize for growth organic debris readily available in the soil of a rubber plantation.

For this purpose the fungus was cultivated in vitro on different organic materials, including decaying leaves and roots of cover crops, e. g. *Pueraria phaseoloides*.

The cultures were prepared in 500 ml Erlenmeyer flasks. Each flask was filled with 50 to 100 g. of the various organic materials and, after the addition of 20 ml of water, was sterilized. The sterile medium then was inoculated by the wet method with 1 ml of inoculum.

As shown in table 6 all strains of *Fomes lignosus* can easily be grown on organic debris if the material is not too extensively decomposed. *Fomes lignosus* is thus capable of living as a saprophyte. The fungus cannot, however, grow on soil alone or on fully decayed substrates. This would indicate the dependence of the fungus on certain vitamins or similar compounds present in the living plant as well as in dead organic material.

Table 6

Growth of *Fomes lignosus* on different organic debris

Substrate	Growth of *Fomes lignosus* (all strains)
Soil (yellow loam) from 10 cm depth	no growth
Soil (red loam) from 10 cm depth	no growth
Fallen rubber leaves (about one month old)	leaves covered with mycelium, a few rhizomorphs
Fallen rubber leaves (well rotted)	mycelium growth very scarce and thin
Mixture of fallen rubber leaves and soil (about one month old)	good mycelium growth on leaves, some rhizomorphs
Fresh pieces of roots of *Hevea brasiliensis*	luxuriant growth of mycelium and of rhizomorphs
Fresh pieces of wood of *Hevea brasiliensis*	good growth of mycelium, well developed rhizomorphs
Fresh pieces of roots of *Thea sinensis*	good growth of mycelium, well developed rhizomorphs
Fresh pieces of roots of *Theobroma cacao*	good growth of mycelium, well developed rhizomorphs
Pieces of unidentified decaying wood	good growth of mycelium, rhizomorphs formation
Pieces of unidentified well rotted wood	scarce and thin growth of mycelium, no rhizomorphs
Cowdung	good growth of mycelium
Decaying leaves of *Pueraria phaseoloides*	good growth of mycelium, some rhizomorphs
Fresh pieces of roots of *Pueraria phaseoloides*	good growth of mycelium, some rhizomorphs

6. Growth on different extracts

Since *Fomes lignosus* was shown to grow on different organic debris, the next question was whether the fungus would also grow on extracts or decoctions of similar organic materials.

For these experiments the basic Knop solution with 10 g/l glucose as carbon source was used, to which different extracts or decoctions were added.

These decoctions were prepared by steaming 100 g. of finely chipped fresh material in 1000 ml of distilled water for 20 minutes. One litre of the liquid culture solution was then made up by taking 250 ml of the extract, diluting it with 750 ml of distilled water and adding the necessary salts to make one litre of the modified Knop solution.

As expected the results, which were similar with all strains of *Fomes lignosus*, show, quite clearly, that the organic extracts contain some substance or substances essential for the growth of *Fomes lignosus* and that these are present in decoctions of fresh plant tissues. On the pure Knop-glucose solution no growth occurred.

Table 7

Growth of *Fomes lignosus* on different decoctions

Substrate	Growth of *Fomes lignosus*
Knop glucose solution	no growth
Knop glucose solution with extract of fresh leaves of *H. brasiliensis*	good growth of mycelium
Knop glucose solution with extract of fresh wood of *H. brasiliensis*	good growth of mycelium, rhizomorphs formed on the glass walls
Knop glucose solution with extract of fresh roots of *H. brasiliensis*	luxuriant growth of mycelium, rhizomorphs formed on the glass walls
Knop glucose solution with extract of fresh leaves of *Pueraria phaseoloides*	good growth of mycelium, some rhizomorphs formed on the glass walls

7. Influence of malt and yeast extracts

When it was found that different plant extracts were able to stimulate the growth of *Fomes lignosus* considerably, the effect of malt and yeast extracts was also tested.

Knop solution with 10 g/l glucose was used as the basic culture medium to which 10 g/l malt extract or 10 g/l yeast extract (Difco) were added.

The results obtained with some strains of *Fomes lignosus* are given in table 8.

Table 8

Mycelium (dry weight in mg) and pH of different strains of *Fomes lignosus* on Knop-glucose, Knop-glucose-malt and Knop-glucose-yeast media

Strain of *Fomes lignosus*	pH Values		Mycelium per flask (dry weight in mg)
	initial	final	
RRIC 10			
Knop-glucose	4.5	4.3	2.0
Knop-glucose-malt	4.6	4.7	300.0
Knop-glucose-yeast	5.3	8.6	309.4
RRIC 28			
Knop-glucose	4.5	4.5	1.5
Knop-glucose-malt	4.6	4.6	402.3
Knop-glucose-yeast	5.3	8.5	417.5
RRIC 32			
Knop-glucose	4.5	4.6	2.5
Knop-glucose-malt	4.6	4.4	491.7
Knop-glucose-yeast	5.3	8.5	547.7
RRIC 44			
Knop-glucose	4.5	4.6	2.0
Knop-glucose-malt	4.6	5.1	428.6
Knop-glucose-yeast	5.3	7.9	494.4

Addition of malt and yeast extracts to the basic solution resulted in excellent growth of *Fomes lignosus*. Both extracts must, therefore, contain certain essential substances required by this fungus.

8. The vitamin requirements

The inability of *Fomes lignosus* to grow on purely synthetic inorganic culture solutions and its ability to grow on organic debris, on materials such as roots, wood and on synthetic media with malt or yeast extracts or with decoctions of organic materials indicate that *Fomes lignosus* requires for growth some specific vitamins. It could therefore be assumed that *Fomes lignosus* would require thiamine, either one or both of its components, as it is generally known that the majority of the *Hymenomycetes*, to which Order *Fomes lignosus* belongs, are partially or totally deficient in thiamine or its components (Gäumann 1951, Jennison, Newcomb and Henderson 1955).

A number of families belonging to the Order *Hymenomycetes* have already been studied with regard to their growth requirements and mention may be made of the following investigations: Fries (1938, 1950), Hacskaylo, Lilly and Barnett (1954), Koegl and Fries (1937), Leonian and Lilly (1938), Perlman (1949), Robbins (1950), Schopfer and Blumer (1940), Yusef (1953) who examined 38 fungi of the genus *Polyporus* and 3 fungi of the genus *Fomes;* Rennerfelt (1945) who worked with *Fomes annosus,* Nord and Sciarini (1946) who studied some fungi of the Order *Meruliaceae,* Kuehlwein and Zoberst (1953) who worked with *Merulius lacrymans,* Jennison, Newcomb and Henderson (1955) who examined 42 different species and Lindeberg (1939, 1944) who investigated a number of species of the genus *Marasmius.*

It must be pointed out that, as reported by Lindeberg (1944), the requirements of fungi for specific essential growth factors may vary with the composition of the synthetic culture media used, and that different strains of the same fungus may even show growth characteristics varying between heterotrophy and autotrophy.

Fungi can be grouped as:

a. fungi requiring no thiamine,
b. fungi requiring thiamine,
c. fungi requiring thiazole,
d. fungi requiring pyrimidine,
e. fungi requiring thiazole + pyrimidine.

As far as can be ascertained from the literature (Jennison, Newcomb and Henderson 1955, Yusef 1953, Spector 1956), *Fomes lignosus* has not been investigated and classified in this respect.

For all the vitamin deficiency experiments in this investigation the basic Knop medium was used. Preliminary experiments showed, as expected, that the source of nitrogen is of importance with regard to the growth behaviour of the fungus and therefore 1 g/l asparagine was added to the basic medium.

Table 9

Mycelium (dry weight in mg) and pH
of different strains of *Fomes lignosus* on Knop solution and with and without asparagine, thiamine, thiazole and pyrimidine, after 28 days at 27 °C

Culture medium	Mycelium per flask (dry weight in mg) and pH of culture medium at the end of the experiment									
	Strain RRIC 10		Strain RRIC 28		Strain RRIC 30		Strain RRIC 32		Strain RRIC 44	
	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH
Knop + 10.0 g/l glucose	2.0	5.8	3.5	4.8	4.1	4.7	2.2	4.9	2.4	4.8
Knop + 10.0 g/l glucose 1.0 g/l asparag.	3.9	5.6	6.0	4.8	2.2	5.2	3.8	5.0	2.8	4.9
Knop + 10.0 g/l glucose 0.5 mg/l thiam.	4.4	5.6	2.8	5.0	1.5	5.2	4.0	5.0	3.6	5.0
Knop + 10.0 g/l glucose 0.5 mg/l thiaz.	2.4	5.2	4.5	5.2	2.4	5.0	2.6	4.9	1.8	4.8
Knop + 10.0 g/l glucose 1.0 g/l asparag. 0.5 mg/l thiam.	345.0	5.0	390.7	4.6	422.8	5.0	341.3	4.5	452.2	5.1
Knop + 10.0 g/l glucose 1.0 g/l asparag. 0.5 mg/l pyrim.	338.4	5.0	378.5	4.8	416.5	5.0	356.4	4.8	441.3	4.6
Knop + 10.0 g/l glucose 1.0 g/l asparag. 0.5 mg/l thiaz.	2.5	5.2	5.5	5.0	3.5	5.2	2.8	4.8	4.5	2.8
Knop + 10.0 g/l glucose 1.0 g/l asparag. 0.5 mg/l thiaz. 0.5 mg/l pyrim.	340.2	5.2	382.5	5.0	410.3	5.0	348.3	5.0	463.4	5.0
Knop + 10.0 g/l glucose 10.0 g/l malt ext.	371.5	4.7	452.3	5.0	491.7	4.4	395.2	4.6	498.6	5.2
Knop + 10.0 g/l glucose 10.0 g/l yeast ext.	409.4	8.6	417.5	8.5	547.7	8.5	425.2	8.4	515.5	8.2

Erb (1958), also used asparagine with advantage as a source of nitrogen in his experiments with different species of fungi of the genus *Merulius*.

All chemicals used in these vitamin experiments were of "Analar" grade, or special "Biochemicals" (Hoffmann-La Roche). In order to restrict the number of experiments, vitamin-free glucose was used as the sole carbon source. Great care was taken to use only especially cleaned glassware.

The results of the experiments with some of the *Fomes lignosus* strains are given in table 9. The preliminary results have already been published (Riggenbach 1957).

Results similar to those shown in table 9 were obtained with strains RRIC 29 and 31 of *Fomes lignosus*.

This experiment clearly reveals that *Fomes lignosus* is a fungus which is unable to synthesize the whole thiamine (thiamine hydrochloride, $C_{12}H_{17}ON_4SCl \cdot HCl$) molecule. It can synthesize only one of its components, thiazole (4-methyl-5-β-hydroxyethyl-thiazole, C_6H_9ONS). The other component, pyrimidine (2-methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidine-dihydrochloride, $C_6H_{10}N_4 \cdot 2\,HCl$) has to be supplied from external sources.

It must be pointed out that all the strains tested did not vary much in this behaviour and that comparable results were obtained in experiments using Fries I and Czapek solution as basic media.

Further, it has been noted that *Fomes lignosus* grows even better on Knop-glucose medium with either malt extract or yeast extract than on merely synthetic growth media with added vitamins. Similar observations have been made with other fungi. Yusef (1953) described this as "malt effect" and the substance or substances responsible for better growth as "malt factor". The "malt factor", however, could not be identified. Improved growth with malt or yeast extract could possibly be due to the presence of organic nitrogen in these media (Foster 1949).

NITROGEN ASSIMILATION

Preliminary trials showed that *Fomes lignosus* would not grow on the basic Knop-glucose medium with 0.5 mg/l thiamine in the absence of asparagine. This indicates that *Fomes lignosus* is not able to utilize nitrates, as present in the Knop solution in the form of $Ca(NO_3)_2$. The following experiments, therefore, concern the nitrogen uptake of *Fomes lignosus*. In order to keep the number of experiments within reasonable limits, the carbon source was restricted only to glucose.

With regard to their ability to assimilate nitrogen in various forms, fungi, according to Robbins (1937), can be classified into four groups:

Group I: able to assimilate N_2, NO_3, NH_3 and organically-bound nitrogen;

Group II: able to assimilate only NO_3, NH_3 and organically-bound nitrogen;

Group III: able to assimilate only NH_3 and organically-bound nitrogen;
Group IV: able to assimilate only organically-bound nitrogen.

It is further known that the nitrogen assimilation of some fungi takes a different course depending on the carbon source and in the presence of various organic acids (FOSTER 1949). Thus *Leptomitus lacteus* and *Apodachyla brachynema* assimilate glycine and asparagine only in the presence of acetate as carbon source (SCHADE 1940). LEONIAN and LILLY (1940), working with different *Mucorales*, showed that the presence of organic acids, such as acetic, lactic, succinic, glutamic, fumaric and others, even in small concentrations (0.01 molar), in the culture medium would considerably increase the uptake of inorganic nitrogen in the form of NH_3 or NO_3. BURKHOLDER and MCVEIGH (1940) obtained similar results with *Phycomyces blakesleeanus*. Commenting on these studies LEONIAN and LILLY (1940) concluded that the presence of a free carboxyl group is either essential for, or greatly stimulates, the assimilation of nitrogen by the fungi under observation. FOSTER (1949), on the other hand, suggests that the stimulation effect of organic acids on the NH_3 assimilation may be connected with the tricarboxylic respiratory cycle.

NORD and SCIARINI (1946) found peptone, urea and asparagine the most easily available nitrogen sources, whilst potassium nitrate, sodium nitrate, ammonium nitrate and some other inorganic nitrogen compounds gave poor results with *Merulius niveus*, *Merulius tremellosus*, *Merulius confluens* and *Fomes annosus*.

ERB (1958) made similar observations working with some other species of the genus *Merulius*. PETER (1956) obtained comparable results with *Aspergillus niger*. He found that the NH_3 assimilation was strongly stimulated by the sodium salts of fumaric, maleic and succinic acid. The assimilation of NO_3, on the other hand, was stimulated by the sodium salts of maleic and succinic acid, but not by the sodium salt of fumaric acid.

It is also believed that these reactions are greatly dependent on the composition of the culture solution and that within one species there may be different reactions of the different strains (CLELAND and JOHNSON (1954). Different species of the same genus may also require different nitrogen sources (LINDEBERG 1944).

The following experiments were designed to find out whether asparagine as nitrogen source could be replaced by other organic or inorganic nitrogen compounds and to obtain additional information on the nitrogen requirements of *Fomes lignosus*.

Knop solution with 10 g/l glucose, with and without 0.5 mg/l thiamine, was again used as standard basic culture medium. The cultures were incubated for 28 days at a temperature of 27 °C.

In the first series of experiments, the results of which are given in table 10, asparagine was replaced as nitrogen source by a number of different ammonium salts.

Table 10

Mycelium (dry weight in mg) and pH
of different strains of *Fomes lignosus* on Knop-glucose-thiamine solution with different ammonium salts after 28 days at 27 °C

Culture medium KG = Knop + 10 g/l glucose	Mycelium per flask (dry weight in mg) and pH of culture medium at the end of the experiment									
	Strain RRIC 10		Strain RRIC 28		Strain RRIC 30		Strain RRIC 32		Strain RRIC 44	
	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH
KG + 0.5 mg/l thiamine	2.6	4.8	4.8	5.2	5.0	5.1	2.5	4.7	4.4	4.9
KG + 1.0 g/l asparagine + 0.5 mg/l thiamine	367.2	4.8	325.0	4.9	365.0	4.9	378.7	5.0	356.9	5.2
KG + 1.0 g/l ammonium nitrate + 0.5 mg/l thiamine	15.2	5.4	63.5	5.2	16.2	5.1	10.9	5.0	14.2	5.0
KG + 1.0 g/l ammonium chloride + 0.5 mg/l thiamine	11.2	5.2	37.5	5.2	9.4	5.0	6.8	5.0	3.5	5.2
KG + 1.0 g/l ammonium sulphate + 0.5 mg/l thiamine	8.4	5.0	47.6	5.0	5.0	5.2	5.2	5.0	7.0	5.1
KG + 1.0 g/l ammonium acetate + 0.5 mg/l thiamine	2.7	5.1	4.5	5.2	1.5	5.1	1.3	4.9	2.7	4.8
KG + 1.0 g/l ammonium citrate + 0.5 mg/l thiamine	309.3	5.4	316.3	5.3	342.0	5.4	307.9	5.1	325.0	5.6
KG + 1.0 g/l ammonium tartrate + 0.5 mg/l thiamine	288.5	5.1	240.1	5.3	234.0	5.4	298.0	5.5	286.7	5.6
KG + 10 g/l malt extract	435.0	5.0	530.0	4.9	478.0	5.0	516.0	5.2	547.0	5.2

Ammonium supplied in the form of ammonium nitrate or ammonium sulphate or ammonium chloride or ammonium acetate barely supports the growth of *Fomes lignosus*. In addition to asparagine, *Fomes lignosus* is also able to utilize, as nitrogen source, ammonium if it is supplied as ammonium citrate or ammonium tartrate and this only if thiamine is present.

In the next series of experiments, different organic compounds, as DL-alanine ($C_3H_7O_2N$), L-glutamic acid ($C_5H_9O_4N$), glycocol ($C_2H_5O_2N$), nicotinic acid ($C_6H_5O_2N$), DL-methionine ($C_5H_{11}O_2NS$), DL-tryptophane ($C_{11}O_{12}O_2N_2$) and urea (H_2NCONH_2) were added separately at a dilution of 1 g/l to the Knop medium containing 10 g/l glucose and 0.5 mg/l thiamine.

Of the above compounds only DL-alanine and L-glutamic acid proved to be readily available sources of nitrogen. On media containing glycocol or urea growth was scanty, whilst on media containing nicotinic acid or DL-methionine or tryptophane practically no growth occurred.

It would appear, therefore, that *Fomes lignosus* has quite specific requirements regarding its nitrogen source. Nitrogen in the form of nitrates cannot be assimilated at all, nitrogen in the form of ammonium or organically-bound nitrogen can only be taken up in certain combinations or from certain compounds.

DECOMPOSITION OF ORGANIC MATERIALS

As *Fomes lignosus* grows well on various types of organic matter and in its natural habitat on tree roots, it was considered useful to ascertain to what extent *Fomes lignosus* is able to use as carbon source different organic materials such as cellulose, starch, sugars, pectin and certain organic acids which are in Nature available to the fungus.

Knop solution was again used as basic culture medium, with the essential asparagine (1.0 g/l) and thiamine (0.5 mg/l) added.

This substrate will be referred to as Knop-asparagine-thiamine solution. As carbon source glucose or any of the above carbohydrates was used.

1. Decomposition of Cellulose

The ability of *Fomes lignosus* to decompose cellulose was tested in solid and in liquid cultures.

In the plate cultures 10 g/l of filterpaper-cellulose were added to the normal malt agar medium which was then inoculated in the usual way with a small cylindrical piece of a well grown (14 days old) *Fomes lignosus* culture and incubated at 27 °C. After 4 to 6 days zinc-chloro-iodine solution was added to the plates. If the fungus is able to decompose the cellulose material a light zone is formed around the colony whilst the remaining part of the plate becomes dark blue.

In the liquid substrate filterpaper-cellulose or methyl-cellulose (Ammann 1951) or ethyl-cellulose or carboxy-methyl-cellulose was added as sole carbon source to the Knop-asparagine-thiamine solution.

Combinations of the celluloses with glucose or other carbon sources were excluded, as the aim of the experiments was to obtain a general idea of the cellulose-decomposing ability of *Fomes lignosus* rather than to carry out detailed studies on the presence or the production of cellulolytic enzymes.

Table 11

Mycelium (dry weight in mg) and pH
of different strains of *Fomes lignosus* on Knop-asparagine-thiamine solution with different celluloses as sole carbon source after 28 days at 27 °C

Culture medium KAT = Knop-asparagine-thiamine solution	Mycelium (dry weight in mg) and pH of culture medium at the end of the experiment									
	Strain RRIC 10		Strain RRIC 28		Strain RRIC 30		Strain RRIC 32		Strain RRIC 44	
	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH
KAT + 10 g/l filterpaper-cellulose $(C_6H_{10}O_5)_x$	growth	7.5	growth	7.3	growth	7.0	growth	7.0	growth	7.1
KAT + 10 g/l methyl-cellulose	361.4	8.1	349.0	7.7	445.9	7·8	344.0	7.7	374.0	7.6
KAT + 10 g/l ethyl-cellulose (OH-groups in 2, 3 and 6 position ethylated)	301.0	7.0	397.5	7.4	463.5	7.4	364.6	7.9	425.2	7.9
KAT + 10 g/l carboxy-methyl-cellulose	362.6	7.6	293.9	6.5	446.3	7.0	376.8	6.2	386.2	6.5
KAT + 10 g/l glucose $(C_6H_{10}O_6)$	327.9	4.8	354.0	5.3	351.0	5.1	384.0	5.6	373.9	5.4

The rate of growth on filterpaper-cellulose was very slow, but on methyl-cellulose or ethyl-cellulose or carboxy-methyl-cellulose *Fomes lignosus* developed well. In solutions, however, without asparagine or thiamine, or both, the fungus did not grow at all.

Fomes lignosus has, as was also found in Petri dish experiments, the ability to decompose and utilize some cellulose materials. Decomposition of methyl-cellulose is indicative of the production by the fungus of the enzyme Zx required for breaking the 1, 4 β-linkages (Reese, Siu and Levinson 1950).

2. Decomposition of Starch

The decomposition of soluble starch, amylose $(C_6H_{12}O_5)_x$, by *Fomes lignosus* was tested on plate cultures as well as in liquid cultures.

For the plate cultures malt agar medium with 10 g/l soluble starch was prepared and inoculated with a disc of 5 mm diameter transferred from a well grown (14 days old) malt agar plate culture of various strains of *Fomes lignosus*. After 4 days of incubation at 27 °C zinc-chloro-iodine was poured over the plates. Starch decomposition, if any, is then indicated by the absence of the iodine reaction on the plate.

The liquid cultures consisted of the Knop-asparagine-thiamine solution with 10 g/l soluble starch as sole carbon source.

The experiments show, quite clearly, that all strains of *Fomes lignosus* are capable of decomposing soluble starch, both on plate cultures and in liquid medium. Again the presence of asparagine and thiamine in the culture solution is essential; if either is omitted *Fomes lignosus* is unable to grow.

3. Decomposition of Sugars

The decomposition of sugars was tested in liquid cultures using the Knop-asparagine-thiamine solution as basic substrate and different sugars as sole carbon source. The cultures were inoculated and incubated in the usual manner.

Under the conditions of the experiment *Fomes lignosus* is not able to decompose the two pentose sugars, L-arabinose and D-xylose. Of the hexoses tested, D-glucose and D-fructose are assimilated but not D-galactose or L-sorbose. The two disaccharides, maltose and saccharose, are poorly assimilated. Raffinose, a trisaccharide, is not utilized at all.

No growth occurs with any of the sugars if either asparagine or thiamine is omitted from the culture medium.

It is interesting to note that *Fomes lignosus* is unable to decompose D-xylose, a sugar which is frequently present in wood (KARRER 1958).

ROBAK (1942) who examined different wood-destroying fungi obtained similar results with *Polyporus abietinus* and *Lenzites saepiaria* which grew poorly on an agar medium with xylose but grew well with other sugars.

4. Decomposition of Pectin

Pectic substances are widely distributed in plant materials and it was therefore of interest to test the ability of *Fomes lignosus* to utilize them. For this purpose a 60 per cent esterified apple pectin was added as sole carbon source to the basic Knop-asparagine-thiamine solution.

In preparing the medium the pectin was first washed twice with absolute ethyl alcohol in a glass Buchner funnel, then dispersed in ethyl alcohol and added to the basic medium.

The experiments were carried out as usual in Erlenmeyer flasks and the cultures were incubated for 28 days at a temperature of 27 °C.

Table 12

Mycelium (dry weight) and pH of *Fomes lignosus* on Knop-asparagine-thiamine solution with different sugars as sole carbon source after 28 days at 27 °C

Culture medium KAT = Knop-asparagine-thiamine solution	Mycelium per flask (dry weight in mg) and pH at the end of the experiment									
	Strain RRIC 10		Strain RRIC 28		Strain RRIC 30		Strain RRIC 32		Strain RRIC 44	
	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH
1. Monosaccharides										
Pentoses $C_5H_{10}O_5$										
KAT + 10 g/l L-arabinose	1.0	5.5	2.0	5.6	1.2	5.5	0.0	5.6	2.5	5.5
KAT + 10 g/l D-xylose	3.5	5.0	3.8	4.9	5.8	5.3	2.2	4.9	2.3	4.5
Hexoses $C_3H_{12}O_6$										
KAT + 10 g/l D-glucose	395.3	5.2	427.8	5.4	462.0	5.2	401.9	5.5	462.2	5.3
KAT + 10 g/l D-galactose	2.3	6.6	6.1	6.6	4.6	6.9	2.5	6.8	3.8	6.7
KAT + 10 g/l D-fructose	349.4	6.1	295.5	6.2	340.4	5.1	284.5	6.0	318.5	5.7
KAT + 10 g/l L-sorbose	5.5	5.1	4.5	5.0	6.2	5.7	4.4	5.2	7.4	5.2
2. Disaccharides										
KAT + 10 g/l saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$	165.7	5.2	184.2	5.3	112.5	5.6	187.3	5.6	172.8	6.0
KAT + 10 g/l maltose $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	158.3	5.9	108.8	5.1	132.7	6.3	115.7	7.2	97.7	7.0
KAT + 10 g/l lactose $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	3.2	5.6	2.2	5.3	2.6	5.7	4.6	5.0	2.7	5.2
3. Trisaccharide										
KAT + 10 g/l raffinose $C_{18}H_{32}O_{16}$ + 5 H_2O	5.6	6.7	7.0	6.8	5.9	6.9	9.2	7.0	9.6	6.8

All the different strains of *Fomes lignosus* proved to be capable of utilizing the pectin as a carbon source and to develop well on the pectin medium. If, however, either asparagine or thiamine was not added to the medium the fungus failed to develop.

5. Degradation of Organic Acids

The degradation of different organic acids and the use of these as carbon sources by *Fomes lignosus* were then studied.

The Knop-asparagine-thiamine solution was again used as basic medium but with different organic acids as sole carbon source. Some of the acids were added as potassium salts and in all experiments the pH was adjusted with normal potassium hydroxide (KOH) to a value of 6.

Table 13

Mycelium (dry weight in mg) and pH of different strains of *Fomes lignosus* on Knop-asparagine-thiamine solution with different organic acids after 28 days at 27 °C

Culture medium KAT = Knop-asparagine-thiamine solution	Mycelium per flask (dry weight in mg) and pH at the end of the experiment							
	Strain RRIC 10		Strain RRIC 28		Strain RRIC 30		Strain RRIC 44	
	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH	dry weight mg	pH
Saturated dicarboxylic acids								
KAT + 10 g/l oxalic acid HOOC · COOH	0.0	4.8	0.0	4.8	0.0	4.6	0.0	4.6
KAT + 10 g l malonic acid HOOC · CH_2 · COOH	0.0	4.8	0.0	4.6	1.2	5.0	1.0	5.0
KAT + 10 g/l succinic acid HOOC · $(CH_2)_2$ · COOH	14.3	5.0	12.1	5.0	12.5	4.9	12.9	4.9
Unsaturated dicarboxylic acids								
KAT + 10 g/l maleic acid HOOC · CH = CH · COOH	0.5	5.0	0.5	5.0	1.2	5.2	1.2	5.3
KAT + 10 g/l fumaric acid HOOC · CH = CH · COOH	12.5	5.0	8.5	4.9	9.5	5.0	15.6	5.9

None of the *Fomes lignosus* strains showed any appreciable growth in any of the above media indicating that, under the conditions of the experiments, oxalic acid, malonic acid, succinic acid, maleic acid or fumaric acid cannot be utilized by *Fomes lignosus* as carbon source.

6. Degradation of Gallic and Tannic Acids

It was considered of interest to examine the question as to whether *Fomes lignosus* is able to break down gallic acid (3.4.5-trihydroxybenzoic acid) or tannic acid, two acids present in wood and bark.

The ability of *Fomes lignosus* to break down gallic acid or tannic acid was tested in Petri dish cultures on malt agar containing either 1 g/l gallic acid or 1 g/l tannic acid, using as criterion the formation of a circle of black discolouration around the growing cultures (Bavendamm 1936).

In all cultures with the different strains of *Fomes lignosus* the formation of pronounced black circles around the growing fungus was observed, providing evidence that *Fomes lignosus* is able to produce the required enzymes for the breakdown of gallic acid and of tannic acid.

Fomes lignosus grew well in liquid cultures, on Knop-asparagine-thiamine solution with 10 g/l glucose to which was added gallic acid at dilutions ranging from 0.01 to 1.0 g/l or tannic acid at dilutions ranging from 0.01 to 0.1 g/l. On media containing tannic acid at a dilution of 1.0 g/l the fungus failed to grow.

Summary

Fomes lignosus (Klotzsch) Bres. which causes the White Root disease of the rubber tree, *Hevea brasiliensis*, and also affects a great number of other cultivated plants is widely distributed in the tropics and is of considerable economic importance.

The causative fungus was cultured and studied *in vitro*. Plate cultures and liquid cultures were used in these studies. Knop solution was found to be the most satisfactory and was therefore selected as basic medium for all liquid cultures.

The results obtained show that:

1. *Fomes lignosus* grows best between 27° and 30 °C, a temperature which closely corresponds to the average mean temperature of the rubber-growing districts of Ceylon.

2. *Fomes lignosus* is a facultative saprophyte and is able to grow on a great variety of organic materials such as fresh or dead leaves, roots, wood, cowdung etc., provided that these materials are not fully decomposed and still contain essential vitamins.

3. *Fomes lignosus* is a partially thiamine-deficient fungus. *Fomes lignosus* is unable to synthesize the whole thiamine molecule. The fungus can synthesize only one component, thiazole, whilst pyrimidine, the other component, has to be supplied from external sources.

4. *Fomes lignosus* when grown on Knop-thiamine solution with glucose as sole carbon source, is unable to assimilate nitrogen as nitrate (NO_3) or as ammonia (NH_3). Ammonia can only be taken up in the presence of certain organic acids, as tartaric or citric acid.

5. *Fomes lignosus* is able to decompose and utilize certain celluloses such as methyl-cellulose. It produces the necessary enzymes for the breakdown of the 1.4 β-linkages.

6. *Fomes lignosus* is able to decompose and assimilate soluble starch.

7. *Fomes lignosus* is able to utilize as carbon source certain sugars, such as glucose, fructose, maltose, saccharose but not L-arabinose, D-xylose, D-galactose, L-sorbose or raffinose.

8. *Fomes lignosus* is able to decompose pectin (60 % esterified apple pectin) and to utilize it as a sole carbon source.

9. *Fomes lignosus* is able to break down gallic and tannic acids.

10. *Fomes lignosus* cannot use as carbon source, oxalic, malonic, succinic, maleic or fumaric acid.

Acknowledgements

The author wishes to express his sincere thanks to the Rubber Research Board for granting permission for the publication of this paper and to Dr. E. D. C. BAPTISTE, Director of the Rubber Research Institute of Ceylon and to Mr. T. W. HOFFMAN for their valuable help in preparing and reading through the manuscript.

Zusammenfassung

Die Weißwurzelfäule des südamerikanischen Kautschukbaumes, *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. und einer großen Anzahl tropischer Nutzpflanzen kann unter Umständen bedeutenden wirtschaftlichen Schaden verursachen.

Der Erreger dieser Weißwurzelfäule, *Fomes lignosus* (Klotzsch) Bres. wurde *in vitro* auf festen und in flüssigen Nährsubstraten auf verschiedene physiologische Eigenschaften untersucht. Für diese Versuche erwies sich die Knopsche Nährlösung als das geeignetste Grundsubstrat.

Die Versuche zeigten:

1. Das Temperaturoptimum von *Fomes lignosus* liegt zwischen 27 bis 30 °C, Werten, die gut mit den Durchschnittstemperaturen der kautschukanbauenden Distrikte von Ceylon übereinstimmen.

2. *Fomes lignosus,* ein fakultativer Saprophyt, entwickelt sich gut auf verschiedenen organischen Substraten wie Laub, Wurzeln, Holz, Kompost usw., sofern diese nicht zu stark zersetzt sind.

3. *Fomes lignosus* vermag Vitamin B_1 (Thiamin, Aneurin) nicht selbst vollständig zu synthetisieren. Der Pilz kann nur Thiazol aufbauen, Pyrimidin muß ihm durch das Nährsubstrat zur Verfügung gestellt werden.

4. Nitrat und Ammoniak werden von *Fomes lignosus* in Knop-Thiamin-Glukose-Nährlösung nicht assimiliert. Ammoniak kann als Stickstoffquelle nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Zitronen- oder Weinsäure verwertet werden.

5. Verschiedene Zellulosen wie z. B. Methylzellulose werden abgebaut und als Kohlenstoffquelle verwertet. Der Pilz besitzt die für die Spaltung der 1.4 β-Bindungen nötigen Enzyme.

6. Lösliche Stärke wird assimiliert.

7. Glukose, Fruktose, Maltose und Sacharose werden als Kohlenstoffquelle ausgenützt. L-Arabinose, D-Xylose und D-Galaktose, L-Sorbose und Raffinose können hingegen nicht verwertet werden.

8. Pektin (60 % verestertes Apfelpektin) wird abgebaut und als Kohlenstoffquelle ausgenützt.

9. Tannin- und Gallussäure können abgebaut werden.

10. Verschiedene organische Säuren wie Bernstein-, Fumar-, Malein-, Malon- und Oxalsäure werden nicht assimiliert.

Literature cited

Ammann, A., 1951: Über die Bildung von Zellulase bei pathogenen Mikroorganismen. Phytopath. Z. **18**, 416—446.

Bavendamm, W., 1936: Erkennen, Nachweis und Kultur der holzverfärbenden und holzzersetzenden Pilze. Abderhalden, Handb. biol. Arbeitsmeth. **12**, 927—1134.

Bazzigher, G., 1953: Beitrag zur Kenntnis der *Endothia parasitica* (Murr.) And., dem Erreger des Kastaniensterbens. Phytopath. Z. **21**, 105—132.

Bose, S. R., and B. K. Bakshi, 1957: *Polyporous lignosus* Klotzsch and its identity. Trans. Brit. Mycol. Soc. **40**, 456—460.

Bryce, G., 1922: The toxicity of lime to *Fomes lignosus* Klotzsch. Bull. Dep. Agric. Ceylon. **64**, 1—17.

Burkholder, P. R., and McVeigh, 1940: Growth of *Phycomyces blakesleeanus* in relation to varied environmental conditions. Amer. J. Bot. **27**, 634—640.

Cleland, W., and M. Johnson, 1954: Traces experiments of the mechanism of citric acid formation by *Aspergillus niger*. J. biol. Chem. **208**, 679—705.

Dassanayake, D. T. E., 1959: Rep. Colombo Obs. **1956**, 1—71.

Erb, W., 1958: Beiträge zur Physiologie der Gattung *Merulius*. Zbl. Bakt. II., **111**, 505—529.

Fischer, E., und E. Gäumann, 1929: Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Gustav Fischer, Jena.

FLÜCK, V., 1955: Untersuchungen über die Pathogenität von Erregergemischen bei Getreidefußkrankheiten. Phytopath. Z. **23**, 177—208.

FOSTER, J. W., 1949: Chemical activities of fungi. Academic Press, New York.

FREY-WYSSLING, A., 1949: Stoffwechsel der Pflanzen. 2. Aufl. Büchergilde Gutenberg, Zürich.

FRIES, N., 1938: Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. Symb. bot. upsaliens. **3**, 1—188.

— —, 1950: Growth factor requirements of some higher fungi. Svensk bot. Tidskr. **44**, 379—386.

GÄUMANN, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Birkhäuser, Basel.

GARRETT, S. D., 1944: Root Disease fungi. Chronica Botanica, Waltham.

— —, 1956: Biology of root-infecting fungi. University Press, Cambridge.

HACSKAYLO, J., V. G. LILLY and H. L. BARNETT, 1954: Growth of fungi on three sources of nitrogen. Mycologia **46**, 691—701.

HILTON, R. N., 1959: Maladies of *Hevea* in Malaya. Rubber Research Institute, Kuala Lumpur.

JENNISON, M. W., M. D. NEWCOMB and R. HENDERSDN, 1955: Physiology of the wood-rotting Basidiomycetes. I. Growth and nutrition in submerged culture in synthetic media. Mycologia **47**, 275—304.

KARRER, W., 1958: Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe. Birkhäuser, Basel.

KOGL, F., und N. FRIES, 1937: Über den Einfluß von Biotin, Aneurin und Meso-Inosit auf das Wachstum verschiedener Pilzarten. 26. Mitteilung über pflanzliche Wachstumsstoffe. Z. Physiol. Chemie **249**, 93—110.

KOHLMEYER, J., 1956: Über den Zellulose-Abbau durch einige phytopathogene Pilze. Phytopath. Z. **27**, 147—182.

KÜHLWEIN, H., und W. ZOBERST, 1953: Zur Frage des Wuchsstoffbedarfs und der Wuchsstoffsynthese von *Merulius lacrymans domesticus* Falck. Arch. Mikrobiol. **18**, 273—288.

LEONIAN, L. H., and V. G. LILLY, 1938: Studies on the nutrition of fungi. I. Thiamine, its constituents, and the source of nitrogen. Phytopathology **28**, 531—548.

— —, and — —, 1940: Studies on the nutrition of fungi. IV. Factors influencing the growth of some thiamine-requiring fungi. Amer. J. Bot. **27**, 18—26.

LINDEBERG, G., 1939: Über das Wuchsstoffbedürfnis verschiedener Arten der Pilzgattung *Marasmius*. Svensk. Bot. Tidskr. **33**, 85—90.

— —, 1944: Über die Physiologie ligninabbauender Boden-Hymenomyzeten. Studien an schwedischen *Marasmius*-Arten. Symb. bot. upsaliens. **8**, 1—183.

— —, 1946: Thiamine and growth of litter-decomposing Hymenomycetes. Bot. Notiser **1946**, 89—93.

MEREDITH, D. S., 1959: The infection of Pine stumps by *Fomes annosus* and other fungi. Ann. Bot. **23**, 455—476.

MURRAY, R. K. S., 1938: Root diseases with special reference to replanting. Rubb. Res. Inst. Ceylon Quart. J. **15**, 24—31.

— —, 1939: Root diseases. Rep. Rubb. Res. Bd. Ceylon **1938**, 30—34.

— —, 1940: Root diseases. Rep. Rubb. Res. Bd. Ceylon **1939**, 50—51.

NAPPER, R. P. N., 1932 a: Observation on the root disease of rubber trees caused by *Fomes lignosus*. J. Rubb. Res. Inst. Malaya **4**, 5—33.

— —, 1932 b: A scheme of treatment for the control of *Fomes lignosus* in young rubber areas. J. Rubb. Res. Inst. Malaya **4**, 34—38.

— —, 1933: Root diseases. Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya **1932**, 95—98.

— —, 1934: Root disease investigations. Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya **1933**, 105—111.

— —, 1937: Root disease investigations. Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya **1936**, 78—83.

— —, 1938 a: Root disease investigations. Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya **1937**, 129—135.

— —, 1938 b: Root disease and underground pests in new plantings. Planter, Kuala Lumpur **19**, 453—455.

— —, 1939: Root disease investigations. Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya **1938**, 116—123.

— —, 1940: Root disease investigations. Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya **1939**, 157—171.

— —, 1941: Root disease investigations. Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya **1940**, 89—100.

Newsam, A., 1959: Disease of the root system. Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya **1956**, 40—44

— —, 1960: Root Disease. Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya **1958**, 49—52.

Nord, F. F., and L. J. Sciarini, 1946: On the mechanism of enzyme action. Part 27. The action of certain wood-destroying fungi on glucose, xylose, raffinose and cellulose Arch. Biochem. **9**, 419—437.

Perlman, D., 1949: Studies on the growth and metabolism of *Polyporus anceps* in submerged culture. Amer. J. Bot. **36**, 180—184.

Petch, T., 1921: The diseases and pests of the rubber tree. Macmillan, London.

Peter, M., 1956: Beiträge zum Problem der Aufnahme und Assimilation von Nitrat durch *Aspergillus niger*. Ber. schweiz. bot. Ges. **66**, 277—317.

Pichell, R. T., 1956: Les pourridiés de l'*Hevea* dans la cuvette congolaise. Publ. Inst. nat. agron. Congo belge **49**, 1—480.

Reese, E. T., R. G. H. Siu and H. S. Levinson, 1950: The biological degradation of soluble cellulose derivates and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J. Bact. **59**, 485—497.

Rennerfelt, E., 1945: Die Entwicklung von *Fomes annosus* Fr. bei Zusatz von Aneurin und verschiedenen Extrakten. Svensk bot. Tidskr. **38**, 153—162.

— —, 1946: Über die Wurzelfäule (*Polyporus annosus* Fr.) in Schweden. Medd. Skogsforskn. Inst. Stockh. **35**, 1—88.

— —, 1957: Untersuchungen über die Wurzelfäule auf Fichte und Kiefer in Schweden. Phytopath. Z. **28**, 259—274.

Riggenbach, A., 1957: *Fomes lignosus*, a pyrimidin-deficient fungus. Nature **180**, 43—44.

— —, 1958: A note on the chemical control of the White Root disease of rubber. Rubb. Res. Inst. Ceylon Quart. J. **34**, 1—3.

Robak, H., 1942: Cultural studies in some Norwegian wood-destroying fungi. Medd. Vestland. forst. Forsøkssta. **25**, 1—248.

Robbins, W. J., 1937: The assimilation by plants of various forms of nitrogen. Amer. J. Bot. **24**, 243—250.

— —, 1950: A survey of the growth requirements of some Basidiomycetes. Mycologia **42**, 470—476.

Roger, L., 1951: Phytopathologie des Pays Chauds. Tome I. Paul Lechevalier, Paris.

Schade, A. L., 1940: The nutrition of *Leptomitus*. Amer. J. Bot. **27**, 376—384.

Schopfer, W. H., et S. Blumer, 1940: Recherches sur la répartition de l'hétérotrophie par rapport a l'aneurine chez les champignons. Arch. Microbiol. **11**, 205—214.

Sharples, A., 1936: Diseases and Pests of the Rubber Tree Macmillan, London.

Spector, W. S., 1956: Handbook of Biological Data. Saunders, Philadelphia.

Stoll, Ch., 1954: Über Stoffwechsel und biologisch wirksame Stoffe von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll., dem Erreger der Bakanaëkrankheit. Phytopath. Z. **22**, 233—274.

van Hell, W. F., 1949: Resultaten von de bestrijding van de witte wortelschimmel in een herplanting. Arch. Rubbercult. **26**, 221—257.

Weir, J. R., 1926: A pathological survey of the Para rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in the Amazon Valley. Dep. Bull. U. S. Dep. Agric. **1380**, 1—129.

Wijewantha, R. T., 1960: Report of the Smallholdings Department. Rep. Rubb. Res. Inst. Ceylon **1959**, 89—99.

Yusef, H. M., 1953: The requirements of some Hymenomycetes for essential metabolites. Bull. Torrey bot. Cl. **80**, 43—64.

Kurze Mitteilungen

From the Institute of Physiological Botany, University of Uppsala

Physiological and morphological studies of some species belonging to the genus *Exobasidium*

By

K. R. Sundström

PHYSIOLOGICAL STUDIES

When this investigation was begun in the early summer of 1958, only two physiological works on *Exobasidium* had been published in which synthetic media were used. The authors, Wolf and Wolf (6) and Hirata (3), showed that fungi from this genus, which are parasites on plants and which often cause galls and hypertrophic spots and shoots, form and exude IAA. An investigation on the development of *Exobasidium Azaleae* was recently published by Göttgens (1). This work also includes some studies of the nutritional physiology of this species. Growth was measured in nutrient solutions of glucose and asparagine of different concentrations, and in solutions of different amino acids as the only nitrogen source. The vitamin requirements of this fungus had been examined, along with its ability to exude them into the culture medium.

The present paper contains a more thorough study of the nutritional requirements of this genus.

Material and methods

The isolation method used was that employed by Graafland (2). Each strain used in this investigation was derived from a single spore. A list of the species studied, their hosts, and the symptoms caused, follows below (Table 1).

Table 1

Species	Isolate No.	Host	Symptom of the disease
E. Vaccinii (Fuck.) Woron.	1—5	*Vaccinium Vitis-idaea*	Hypertrophic spots on leaves
E. Vaccinii (Fuck.) Woron.	6	*Vaccinium uliginosum*	Small hypertrophic spots on leaves
E. Vaccinii (Fuck.) Woron.	7	*Vaccinium Oxycoccus*	Small hypertrophic spots on leaves
E. Vaccinii (Fuck) Woron.	8	*Arctostaphylus uva ursi*	Small hypertrophic spots on leaves
E. Karstenii Sacc. & Trott.	1—4	*Andromeda polifolia*	Systemic
E. angustisporum Linder	1	*Arctostaphylus alpina*	Systemic
E. Cassiopes Peck	1	*Cassiope tetragona*	Systemic
E. Myrtilli Siegm.	1—3	*Vaccinium Vitis-idaea*	Systemic
E. Myrtilli Siegm.	4—7	*Vaccinium Myrtillus*	Systemic

The nomenclature is in accordance with Fungi Exsiccati Suecici, Praesertim Upsalienses (4).

It appears from the list that the attacks of the fungi can be either limited to spots or systemic, where the whole plant or shoots are subjected to the infection. The size of the spores, their form, the number of sterigmata, together with the picture of the disease and the choice of host, are the only characters which are generally used in order to divide the genus into species. The value of these characters has been judged very differently. All isolates which have been examined belong, according to SAVILE (5), to the same species (*E. Vaccinii*). This extreme opinion does not seem very probable. It is difficult to limit the species with any certainty with the existing knowledge of this genus.

It ought to be possible by starting with several strains from each species and with several species represented, to determine which physiological characters are stable and usable for the characterization and identification of the different species of the genus. In my investigation, synthetic and liquid nutrient solutions were used, and after having determined the optimal conditions for cultivation, a methodical search for the physiological properties began. The ability of the strains to utilize different carbon and nitrogen sources, as well as their power to synthesize vitamins, were tested.

Results

pH: Each isolate grew best at a low pH. The optimum growth of the different species was between pH 3.0 and 5,0, while the growth in an alkaline medium was poor.

Temperature: The growth was measured both linearly and turbidimetrically. There was a good correlation between the two methods of measurement. The optimum temperature for growth of the species follows below:

E. Vaccinii	19—25 °C
E. Karstenii	19—25 °C
E. Myrtilli	14—19 °C
E. Cassiopes	14—19 °C
E. angustisporum	14—19 °C

Table 2

The growth of the investigated strains

on vitamin B_1 and its components, as well as on different carbon sources, is indicated in the following manner: 0 = No growth, + = Slight growth, × = Good growth

Species Isolate no.		Diagnostic characters													
		No vitamins	Thiamine	Pyrimidine	Thiazole	Thiaz. + Pyrim.	D-glucose	D-arabinose	D-xylose	D-cellobiose	D-maltose	Starch	Lactic acid	Citric acid	Arbutin
E. Vaccinii	1	0	×	0	0	×	×	×	×	0	×	0	0	+	0
E. Vaccinii	2	0	×	0	0	×	×	×	×	0	×	0	0	+	0
E. Vaccinii	3	0	×	0	0	×	×	×	×	0	×	0	0	+	0
E. Vaccinii	4	0	×	0	0	×	×	×	×	0	×	0	0	+	0
E. Vaccinii	5	0	×	0	0	×	×	×	×	0	×	0	0	+	0
E. Vaccinii	6	0	×	×	0	×	×	+	×	+	×	×	×	×	0
E. Vaccinii	7	0	×	×	0	×	×	+	×	×	×	×	×	×	0
E. Vaccinii	8	0	×	×	0	×	×	+	×	×	×	×	×	×	0
E. Karstenii	1	0	×	×	0	×	×	+	+	0	0	0	0	+	+
E. Karstenii	2	0	×	×	0	×	×	+	+	0	0	0	+	+	+
E. Karstenii	3	0	×	+	0	×	×	+	+	0	0	0	+	+	×
E. Karstenii	4	0	×	×	0	×	×	+	+	0	0	0	+	+	+
E. angustisporum		0	×	0	0	×	×	×	×	0	0	0	+	×	×
E. Cassiopes		×	×	×	×	×	×	+	0	×	0	0	+	0	×
E. Myrtilli	1	×	×	×	×	×	×	0	×	×	0	0	+	0	+
E. Myrtilli	2	×	×	×	×	×	×	0	×	×	0	0	+	0	+
E. Myrtilli	3	×	×	×	×	×	×	0	×	+	0	0	0	0	+
E. Myrtilli	4	0	×	×	0	×	×	0	×	0	0	0	0	0	+
E. Myrtilli	5	0	×	×	0	×	×	0	×	0	0	0	0	0	+
E. Myrtilli	6	0	×	×	0	×	×	0	×	0	0	0	0	0	+
E. Myrtilli	7	0	×	×	0	×	×	0	×	0	0	0	0	0	+

Vitamins: The strains studied were vitaminautotrophic, except for vitamin B_1. The ability to synthesize B_1 and its components appears in Table 2.

Nitrogen: All strains grew well on organic nitrogen, nitrate-nitrogen and ammonium-nitrogen.

Carbohydrates: A: utilized by all species: D-galactose, sucrose, raffinose, L-arabinose, D-ribose, erythritol, D-mannitol, sorbitol, succinic acid.

B: not utilized: sorbose, lactose, melibiose, rhamnose, dulcitol.

C: utilized variously, see Table 2.

As appears from Table 2, each isolate belonging to the same species, and which infects the same host, is almost identical in regard to the tested physiological properties (even when the geographical distance between the isolates is large). Striking differences may occur between strains isolated from different hosts.

In order to define more clearly the relationships existing between the investigated strains, experiments on infections and serological studies are being performed.

MORPHOLOGICAL STUDIES

One morphological character, which has been strikingly constant, is the manner of germination of the basidiospores. The investigations have been made on different agar substrates. *E. Vaccinii*, *E. Karstenii* and *E. angustisporum* have basidiospores which grow out with short germ-tubes from which conidia are formed. In *E. Myrtilli* and *E. Cassiopes*, long germ-tubes grow out, and a ramified mycelium develops, upon which a small number of conidia are produced. Conidia and mycelia have been studied under varying physiological conditions. A cysteine concentration of 10^{-2} M can transform *E. Myrtilli* from the mycelial into the conidial form.

A more detailed account of the physiology and the morphology of *Exobasidium* will be published.

Summary

The delimitation of various *Exobasidium* species is rather doubtful. Physiological and morphological studies of some species of the genus *Exobasidium*, isolated from 8 different *Ericaceae* species, have been carried out in an attempt to clarify the taxonomic disorder in this genus. Physiological characters which can be used for characterization are assembled in Table 2. The ability to utilize different carbon sources and synthesize vitamin B_1 and its components is almost identical in isolates of the same species, isolated from the same host. On the other hand differences may occur between isolates from different hosts.

Zusammenfassung

Die Abgrenzung verschiedener Arten der Gattung *Exobasidium* ist ziemlich unsicher. Physiologische und morphologische Studien an einigen Arten dieser Gattung, die von verschiedenen Ericaceen-Arten isoliert waren, wurden durchgeführt, um zu versuchen, die Unsicherheit in der Taxonomie von *Exobasidium* zu klären.

Für die Charakteristik brauchbare physiologische Eigenschaften sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Die Fähigkeit, verschiedene Kohlenstoffquellen auszunutzen und Vitamin B_1 sowie dessen Komponenten zu bilden, ist bei Isolaten derselben Art, die vom selben Wirt isoliert wurden, fast identisch. Andererseits können Unterschiede zwischen Isolaten von verschiedenen Wirten auftreten.

References

1. Göttgens, E., 1959: Untersuchungen über die Physiologie der Entwicklung von *Exobasidium Azaleae* Peck. und seine Infektion der Wirtspflanzen unter besonderer Berücksichtigung der gallenbildenden Wirkstoffe. Phytopath. Z. **38**, 394—426.
2. Graafland, W., 1953: Four cultures of *Exobasidium* in pure culture. Acta bot. Neerl. I, 516—522.
3. Hirata, S., 1957: Studies on the phytohormone in the malformed portion of the diseased plants. Auxin formation on the culture grown *Exobasidium, Taphrina* and *Ustilago* spp. Ann. Phytopathological Soc. Japan, Vol. 22, **3**, 153—158.
4. Lundell, S., et J. A. Nannfeldt: F. Exs. suec. Fasc. LI—LII.
5. Savile, D. B. O., 1959: Notes on *Exobasidium*. Canad. J. Botany 37, **2**, 641—656.
6. Wolf, F. T., and F. A. Wolf, 1952: Pathology of *Camellia* leaves infected by *Exobasidium camelliae* var. *gracilis* Shirai. Phytopathology **42**, 147.

Department of Botany, Faculty of Science, University of A'in Shams, Cairo, U. A. R.

Antagonistic action of *Penicillium chrysogenum* in the control of tomato *Fusarium* wilt

By

Y. A. Youssef, M. Sc., Ph. D.

With one figure

Introduction

The phenomenon of antagonism between microorganisms has received much attention during the past few decades. The part played by secondary organisms in the development of plant diseases under natural conditions has been increasingly studied.

Mostafa and Gayed (1952) demonstrated that *Trichoderma viride* and *Fusarium vasinfectum* were antagonistic to each other in culture. Vasudeva (1953) working on the interaction of certain soil saprophytes and *Fusarium udum* the wilt of pigeon-pea, found that filtrates of *Aspergillus niger, Rhizopus nigricans* and mixed filtrates of all saprophytes inhibited the growth of the pathogen. Buxton (1957) reported that the germination of spores of three physiologic races of *Fusarium oxysporum* f. *pisi* was inhibited by water extracts of rhizosphere soils of certain cultivars.

Material and methods

Fusarium oxysporum Schlecht (em.) Snyder and Hansen was isolated from wilted North Dakota tomato seedlings. A strain of *Penicillium chrysogenum* was isolated from soil in a program seeking for antagonistic soil microorganisms to different plant pathogens. In vitro the two organisms were grown near each other on Czapek-Dox agar in which *Penicillium* had grown for four days. A crude filtrate of a 21-day old *Penicillium* culture in Czapek-Dox broth was sterilized by passage through Seitz filter. This filtrate and water were added to doubled-strength Czapek-Dox liquid in amounts to make single strength Czapek-Dox liquid containing 10, 40, 70 per cent filtrate. Five Erlenmeyer flasks (250 ml.) each containing 25 ml. of the filtrate at each concentration and five flasks containing Czapek-Dox only were prepared. These were inoculated each with 0,5 ml standard *Fusarium* spore suspension and incubated at 28 °C for 10 days and the mycelial dry weights in mgm. were measured. Sets of thirty of two week old North Dakota seedlings were used in the following treatments of soil and seedlings inoculations.

1. *Fusarium*-inoculated plants were transplanted to soil containing pots.

2. *Fusarium*-inoculated plants were transplanted to *Penicillium*-infected soil in pots.

3. *Fusarium*-inoculated plants were transplanted to pots which were irrigated every two days by *Penicillium* filtrate of varying concentrations.

4. Plants transplanted to *Fusarium* infested soil in pots after placing in 250 ml. Erlenmayer flasks containing a 21 old macerated *Penicillum* culture.

5. Plants transplanted to untreated soil in pots contamination with *Fusarium* was performed by dipping the roots of the seedlings for five minutes in a heavy suspension of *Fusarium* prepared by macerating 10 days old culture. Soil and pots were sterilized by steaming. Potted seedlings were left under continuous observation, for thirty days. Plating were made of all plants inoculated with *Fusarium.* Root and stem sections were submerged in 0.001 per cent $HgCl_2$ for one minute and momentarily immersed in 96 % alcohol and flamed. They were transferred to Czapek-Dox agar in Petri-dishes and incubated at 28 °C.

Results

When plates of agar in which *Penicillium* had been growing for four days were inoculated with *Fusarium,* the inhibition of *Fusarium* was striking (Fig.).

This appeared from the neutral zone between cultures of the two organisms. On the other hand a comparison of *Fusarium* mycelial growth, in response to the different concentrations of *Penicillium* filtrate showed that the filtrate contained metabolites suppressive for mycelial growth. The inhibitory factor was most prominant by increasing filtrate concentration.

A. Inhibition of *Fusarium oxysporum* (F) by *Penicillium chrysogenum* (P) when margins of colonies were in close proximity. B. *Fusarium oxysporum* culture. C. *Penicillium chrysogenum* culture

North Dakota tomato cultivar was proved to be highly susceptible to *Fusarium oxysporum* whereas 28 of the plants had typical wilt symptoms. The presence of *Penicillium* culture resulted in the reduction of *Fusarium* wilt symptoms as the number of wilted plants reached 18. Reduction of wilted plants was also obtained when applying *Penicillium* filtrate. It was more obvious when using 70 % filtrate concentration. The number of wilted plants were 8.

Discussion

Experiments under controlled conditions have shown that *Fusarium oxysporum* can be prevented from attacking tomato to a certain extent by the saprophytic fungus *Penicillium chrysogenum*. Reduction of *Fusarium* wilt symptoms by *Penicillium* cultures and filtrates might be possibly attributed to the presence of antifungal metabolites. When inoculated tomato seedlings were irrigated with various concentrations of *Penicillium* filtrate, the lower disease ratings were associated with the higher filtrate concentrations. Evidence that antibiotics pass through roots was obtained by GOPALKRISHNAN and JUMP (1952), who found that tomato plants treated with thiolutin (an antibiotic obtained from *Streptomyces albus*) and then inoculated with *Fusarium* remained free from *Fusarium* wilt symptoms, although stunting occurred at higher concentrations and *Fusarium* was reisolated from plants treated at lower concentrations.

Summary

Penicillium chrysogenum isolated from garden soil has inhibitory effect on *Fusarium oxysporum* Schlecht. (em.) Snyd. and Hans. when the two organisms grew near each other on Czapek-Dox agar in Petri dishes. 10, 40, 70 per cent concentrations of a crude filtrate from broth cultures of *Penicillium chrysogenum*, when added to liquid Czapek-Dox, inhibited *Fusarium oxysporum*.

Symptoms of *Fusarium* wilt were inhibited in tomato plants treated with *Penicillium chrysogenum* cultures or filtrates.

Zusammenfassung

Ein aus Gartenerde isolierter Stamm von *Penicillium chrysogenum* zeigte einen Hemmeffekt gegenüber *Fusarium oxysporum* Schlecht., wenn die beiden Organismen zusammen auf Czapek-Dox-Agar in Petrischalen kultiviert wurden. 10, 40 und 70%ige Konzentrationen eines rohen Filtrates aus flüssigen Kulturen von *Penicillium chrysogenum* vermochten, auf Czapek-Dox-Nährlösung gebracht, *Fusarium oxysporum* zu hemmen. Die Symptome der *Fusarium*-Welke wurden bei Tomaten vermindert, wenn die Pflanzen mit Kulturen oder Kulturfiltraten von *Penicillium chrysogenum* behandelt wurden.

References

BUXTON, E. W., 1957: Trans. Brit. Mycol. Soc. 40, 145—154.
GOPALKRISHNAN, K. S., and J. A. JUMP, 1952: Phytopathology 24, 38—39.
MOSTAFA, M. A., and S. K. GAYED, 1952: Nature 169, 4296.
VASUDEVA, R. S., and C. V. GOVINDASWAMY, 1953: Ann. Appl. Biol. 40, 573—582.

Soeben erschien:

Die Nadelgehölze

Systematische Übersicht und alphabetisches Verzeichnis mit Beschreibungen und Bewertungen der in Mitteleuropa winterharten Nadelgehölze, einschließlich einiger nicht winterharter Arten und Formen

Eine Nadelholzkunde für die Praxis

Von GERD KRÜSSMANN
Leiter des Botanischen Gartens in Dortmund

2., neubearbeitete Auflage

343 Seiten mit 1483 Gehölzbeschreibungen, 226 teils ganzseitigen Fotos und 193 Zeichnungen im Text und auf Tafeln. Ganzleinen DM 46,—

Der durch zahlreiche Standardwerke international bekannte Dendrologe beschreibt hier in alphabetischer Reihenfolge die wichtigsten Merkmale von 350 Arten und 1133 Gartenformen der in Mitteleuropa winterharten Nadelgehölze, die in Kultur angetroffen werden. Die bei Koniferen besonders komplizierte Bestimmung wurde durch eine anschauliche Darstellung aller wichtigen Merkmale in Text und Abbildungen erleichtert. Die zahlreichen und aus aller Welt zusammengetragenen Abbildungen zeigen die Pflanzen an ihren heimischen Standorten. Neben Habitusbildern werden bei schwer bestimmbaren Arten noch Zapfen, Zweige, Nadeln, Samen usw. dargestellt. Die Nomenklatur entspricht dem neuesten Stande der internationalen Vereinbarungen. Das Buch ist bereits in seiner ersten Auflage zu einem Standardwerk der dendrologischen Literatur geworden. Allen Fachleuten und interessierten Laien wird es ein unentbehrliches Nachschlagewerk sein.

Vom gleichen Verfasser liegt vor:

Handbuch der Laubgehölze

in zwei Bänden

Band I (Lieferung 1 bis 7): 1960. 504 Seiten und 164 Kunstdrucktafelseiten mit insgesamt 684 Abbildungen im Text und auf Tafeln.

(Subskriptionspreis) Ganzleinen DM 148,—

Band II erscheint in etwa 7 Lieferungen in vierteljährlicher Folge. Jede Lieferung umfaßt etwa 72 Textseiten und 24 Kunstdrucktafelseiten. Der ermäßigte Subskriptionspreis je Lieferung beträgt DM 18,60. Er erlischt mit dem Erscheinen der letzten Lieferung.

„Die einführende Terminologie erläutert in Worten und Zeichnungen genauestens alle botanischen und technischen Begriffe, so daß jedes Mißverständnis ausgeschlossen sein sollte. Auch das Verzeichnis der botanischen Autoren und Gärtner gibt in der kurzen beschreibenden Form wertvolle Hinweise und wird bestimmt viele noch bestehende Zweifel klären helfen. Durch die vielen eindringlichen Zeichnungen und Bilder wird die Textierung auf das wertvollste unterstützt. Das Buch wird in dieser Form und Aufmachung sicherlich für den Dendrologen, den interessierten Laien und vor allém auch für den gärtnerischen Nachwuchs ein unentbehrliches Studien- und Nachschlagewerk werden. Der Name des Verfassers bürgt dafür, daß das ‚Handbuch der Laubgehölze' ein dendrologisches Standardwerk von bleibendem Wert wird."
Die neue Landschaft

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Handbuch der Pflanzenkrankheiten

Begründet von P. SORAUER

In sechs Bänden herausgegeben von Prof. Dr. Dr. h. c. O. APPEL †,
Prof. Dr. Dr. h. c. H. BLUNCK †, Prof. Dr. B. RADEMACHER, Prof. Dr. H. RICHTER

VI. Band: Pflanzenschutz

2. Auflage in 4 Lieferungen

Soeben erschien:

3. Lieferung

Biologische Schädlingsbekämpfung

Bearbeitet von Dr. J. M. FRANZ, Darmstadt

Die technischen Mittel des Pflanzenschutzes

Bearbeitet von Dr.-Ing. H. KOCH, Braunschweig, Dr. H. GOOSSEN, Münster

Herausgegeben von Prof. Dr. H. RICHTER, Braunschweig

643 Seiten mit 380 Abbildungen. Gr. 8 °. Ganzleinen DM 190, —

Bei gleichzeitiger Abnahme aller Lieferungen des Bandes VI
wird ein Preisnachlaß von 10 % gewährt.

Neue wissenschaftliche Erkenntnisse und der stürmische Aufschwung, den Chemie und Technik in den letzten beiden Jahrzehnten genommen haben und der noch in vollem Fluß ist, haben auch auf dem Gebiet des Pflanzenschutzes in Forschung und Praxis eine bisher ungeahnte Entwicklung ausgelöst. Daher kommt der Neubearbeitung von Einzelfragen dieses Themas im Rahmen des Gesamtwerkes des „Handbuches der Pflanzenkrankheiten" eine besondere Bedeutung zu. Die jetzt vorliegende 3. Lieferung des VI. Bandes enthält eine völlig neue und umfassende Bearbeitung der Kapitel „Biologische Schädlingsbekämpfung" und „Die technischen Mittel des Pflanzenschutzes".

Die Abhandlung über die biologische Schädlingsbekämpfung wurde von dem für dieses Fachgebiet verantwortlichen Institutsleiter der Biologischen Bundesanstalt verfaßt und basiert sowohl auf den von diesem Institut in langen Jahren gesammelten Erfahrungen als auch auf der Auswertung der Erkenntnisse des Auslandes. Die Darstellung der technischen Mittel des Pflanzenschutzes erfolgte durch einen erfahrenen Techniker und Institutsleiter der Biologischen Bundesanstalt gemeinsam mit einem im Deutschen Pflanzenschutzdienst tätigen Fachmann für den praktischen Einsatz der Pflanzenschutzgeräte. Sie ist inhaltlich so ausführlich gehalten und so reichhaltig illustriert, daß die Entwicklungsformen der Pflanzenschutzgeräte und ihre Anwendungsmöglichkeiten besonders deutlich werden und die Abhandlung nicht nur Auskunft über den augenblicklichen Stand gibt, sondern zugleich richtungweisend für den weiteren Gang der Modernisierung dieses Industriezweiges sein kann.

Den einzelnen Abschnitten des Textes sind Literaturverzeichnisse nachgestellt, die ein intensiveres Studium von Einzelfragen ermöglichen. Die leichte Benutzbarkeit wird weiter erhöht durch je ein umfangreiches Schlagwortverzeichnis für jedes Sachgebiet.

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG